

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Mgr. Lenka Sadílková

**Vztah struktury a funkce a využití RTX proteinů
gramnegativních bakterií**

**Structure-function relationships and use of RTX proteins
of Gram-negative bacteria**

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: doc. Ing. Peter Šebo, CSc.

Školitel konzultant: Ing. Radim Osička, Ph. D.

Praha, 2013

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem řádně citovala. Tato práce nebyla použita k získání jiného nebo obdobného druhu vysokoškolské kvalifikace.

V Praze dne 12. 3. 2013

Podpis:

Prohlášení spoluautorů

Prohlašujeme, že Mgr. Lenka Sadílková rozhodujícím způsobem přispěla ke vzniku všech článků, které jsou uvedeny v autoreferátu této disertační práce. Podílela se na všech experimentech, na jejich plánování a na interpretaci výsledků.

V Praze dne

.....

doc. Ing. Peter Šebo, CSc.

Ráda bych zde vyslovila poděkování doc. Ing. Petru Šebovi, CSc. za vytvoření ideálních podmínek pro vypracování a úspěšné dokončení této disertační práce.

Dále pak Ing. Radimu Osičkovi, Ph. D. za nedocenitelné rady a připomínky, které mi umožnily prezentovat práci přínosnou jak pro základní, tak i aplikovaný výzkum.

V neposlední řadě patří mé díky i kolegům, bez jejichž přispění by se tato práce neobešla, a to zejména MVDr. Jiřímu Nepeřenému, Ph. D. (Bioveta, a. s.) za experimentální práci na zvířatech a Mgr. Pavlu Mackovi, Ph. D. za NMR analýzy.

Závěrem bych chtěla vyjádřit poděkování manželu Františkovi za jeho trpělivost a pochopení pro mou práci, a mé největší díky dcerám Zuzance a Moničce za jejich zářící úsměv, jenž mne v mysli i ve skutečnosti provázel těmi nejtěžšími okamžiky.

OBSAH

1 ÚVOD.....	- 1 -
2 INTRODUCTION.....	- 3 -
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	- 5 -
3.1 Interakce mezi patogenem a hostitelem.....	- 5 -
3.2 RTX Proteiny.....	- 6 -
3.2.1 RTX Toxiny	- 6 -
3.2.2 RTX Proteiny s neznámou funkcí.....	- 11 -
3.3 <i>Neisseria meningitidis</i>	- 12 -
3.3.1 Patogenita a aktory virulence bakterie <i>Neisseria meningitidis</i>	- 13 -
3.3.2 Kolonizace hostitele a imunitní odpověď	- 15 -
3.3.3 Železem-regulovaný protein C (FrpC)	- 17 -
3.3.3.1 Exprese a sekrece FrpC	- 17 -
3.3.3.2 Struktura a funkce proteinu FrpC	- 19 -
3.3.3.3 Samoštěpitelný modul (SPM) proteinu FrpC.....	- 22 -
3.4 Využití samoštěpitelných afinitních kotev pro purifikace rekombinantních proteinů.....	- 23 -
3.5 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	- 26 -
3.5.1 Faktory virulence a patogenita <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	- 26 -
3.5.2 Patogeneze aktinobacilové pleuropneumonie a imunitní odpověď hostitele	- 28 -
3.5.2.1 Kolonizace hostitele.....	- 29 -
3.5.2.2 ApfA.....	- 29 -
3.5.2.3 Struktura a funkce transferin-vázacího proteinu B (TbpB).....	- 31 -
3.5.2.4 Apx proteiny	- 32 -
3.5.3 Vakcinace proti aktinobacilové pleuropneumonii	- 33 -
4 CÍLE.....	- 35 -
4.1 Studium mechanismu autokatalytického štěpení RTX proteinu FrpC bakterie <i>N. meningitidis</i>	- 35 -
4.2 Příprava rekombinantních antigenů bakterie <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> a jejich využití v experimentální vakcíně proti prasečí pleuropneumonii	- 37 -
5 MATERIÁLY A METODY	- 38 -
5.1 Seznam použitých chemikálií.....	- 38 -
5.2 Přístrojové vybavení.....	- 40 -
5.3 Použité restriční endonukleasy.....	- 41 -
5.4 Ostatní enzymy	- 42 -
5.5 Seznam použitých protilátek.....	- 42 -
5.6 Použité roztoky a pufry.....	- 43 -
5.7 Syntetické oligonukleotidy.....	- 48 -
5.8 Použitá kultivační média	- 51 -
5.8.1 Kultivační média pro bakteriální kultury.....	- 51 -
5.8.1.1 Tekutá kultivační média.....	- 51 -

5.8.1.2 Tuhá kultivační média	- 52 -
5.8.2 Ostatní Kultivační média	- 53 -
5.9 Plasmidy.....	- 53 -
5.10 Bakteriální kmeny	- 54 -
5.11 Metody a pracovní postupy	- 54 -
5.11.1 Stanovení počtu CFU (Colony-Forming Units).....	- 54 -
5.11.2 Uchovávání bakteriálních kmenů	- 55 -
5.11.3 Příprava superkompetentních buněk <i>Escherichia coli</i>	- 55 -
5.11.4 Transformace plasmidové DNA do superkompetentních buněk	- 55 -
5.11.5 Izolace chromosomální a plasmidové DNA	- 56 -
5.11.5.1 Izolace chromosomální DNA	- 56 -
5.11.5.2 Minipreparace plasmidové DNA	- 56 -
5.11.5.3 Midipreparace plasmidové DNA	- 57 -
5.11.6 Manipulace s plasmidovou DNA.....	- 57 -
5.11.6.1 Štěpení plasmidové DNA restrikčními endonukleasami.....	- 57 -
5.11.6.2 Zatupení kohesních konců fragmentů plasmidové DNA	- 57 -
5.11.6.3 Ligace fragmentů DNA	- 58 -
5.11.6.4 Amplifikace fragmentů plasmidové DNA	- 58 -
5.11.6.5 Elektroforesa DNA fragmentů v agarosovém gelu	- 58 -
5.11.6.6 Izolace DNA fragmentů z agarosového gelu	- 59 -
5.11.7 Sekvence plasmidové DNA	- 59 -
5.11.8 Produkce rekombinantních proteinů a příprava buněčných extraktů pro purifikaci	- 59 -
5.11.8.1 Produkce proteinů v 500 ml třepané kultuře	- 59 -
5.11.8.2 Izolace proteinů z bakteriální kultury	- 60 -
5.11.8.3 Příprava cytosolického extraktu.....	- 60 -
5.11.8.4 Příprava močovinnového extraktu	- 60 -
5.11.9 Purifikace rekombinantních proteinů.....	- 61 -
5.11.9.1 Purifikace iontoměničovou chromatografií na DEAE-Sephadex	- 61 -
5.11.9.2 Purifikace afinitní chromatografií na imobilizovaném iontu kovu na Ni-NTA agarose...-	- 61 -
5.11.9.3 Purifikace afinitní chromatografií na glutathion agarose	- 61 -
5.11.9.4 Převedení proteinu do požadovaného pufru gelovou permeační chromatografií na Sephadexu G-25	- 62 -
5.11.10 Elektroforesa v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)	- 62 -
5.11.11 Western blot	- 62 -
5.11.12 Stanovení koncentrace proteinů.....	- 63 -
5.11.13 Příprava suspenze erytrocytů.....	- 63 -
5.11.13.1 Stanovení hemolytické aktivity rekombinantních Apx proteinů	- 63 -
5.11.14 ¹ H, ¹³ C NMR spektroskopie	- 64 -
5.11.15 Manipulace s kmeny <i>A. pleuropneumoniae</i>	- 64 -
5.11.15.1 Příprava bakteriálních kultur <i>A. pleuropneumoniae</i>	- 64 -
5.11.16 Analýza produkce proteinů <i>A. pleuropneumoniae</i> a detekce specifických protilátek	- 64 -
5.11.17 Protilátková odpověď a příprava hyperimunních sér proti rekombinantním proteinům <i>A.</i> <i>pleuropneumoniae</i>	- 65 -
5.11.17.1 Experimentální zvířata	- 65 -
5.11.17.2 Imunizace myši	- 66 -

5.11.17.3 Imunizace prasat	- 66 -
5.11.18 Čelenžní experimenty na prasatech	- 67 -
5.11.18.1 Příprava kultury <i>A. pleuropneumoniae</i> pro čelenžní experimenty a infekce prasat	- 67 -
5.11.18.2 Stanovení LD ₅₀ <i>A. pleuropneumoniae</i> pro prasata	- 67 -
5.11.18.3 Infekce prasat	- 67 -
5.11.18.4 Reisolace, identifikace a serotypizace <i>A. pleuropneumoniae</i>	- 68 -
6 VÝSLEDKOVÁ ČÁST	- 69 -
6.1 Výsledky studia bakterie <i>N. meningitidis</i>	- 69 -
6.1.1 Studium vztahu struktury a funkce SPM proteinu FrpC	- 69 -
6.1.1.1 Autokatalytické štěpení molekuly FrpC	- 69 -
6.1.1.1.1 Konstrukce expresních vektorů pro produkci fúzních proteinů nesoucích samoštěpitelnou afinitní kotvu založenou na SPM proteinu FrpC	- 70 -
6.1.1.2 Určení minimální části SPM proteinu FrpC nezbytné pro její autokatalytické štěpení	- 77 -
6.1.1.2.1 Predikce nestabilních oblastí v sekvenci SPM pro účely deleční mutagenese	- 77 -
6.1.1.2.2 Deleční mapování minimálního segmentu SPM	- 79 -
6.1.1.2.3 Mapování sekvence mezi aminokyselinovými zbytky v pozicích 153 a 177 SPM	- 81 -
6.1.1.2.4 Nalezení minimální části SPM nezbytné pro jeho autokatalytické štěpení	- 82 -
6.1.1.2.5 Určení teplotní stability jednotlivých variant fúzních SPM proteinů	- 82 -
6.1.1.2.6 Srovnání SPM vs. SPM _{IV} proteinu ApxIVA <i>A. pleuropneumoniae</i>	- 83 -
6.1.1.2.7 Štěpení proteinu FrpC nesoucího SPM _{IV} proteinu ApxIVA záměnou za SPM proteinu FrpC	- 87 -
6.1.1.3 Strukturní analýza SPM ₁₇₇ pomocí metod nukleární magnetické rezonance a mutagenese aspartátu v pozici 165 SPM ₁₇₇	- 89 -
6.1.1.3.1 Vyhledání konzervovaných částí sekvence SPM různých bakteriálních druhů – porovnání se sekvencí SPM ₁₇₇	- 89 -
6.1.1.3.2 Štěpení SPM ₁₇₇ -His a SPM ₁₇₇ -His proteinů nesoucích mutaci Asp 165 a ¹ H NMR studie proteinu SPM ₁₇₇ -His	- 91 -
6.1.1.4 Mutagenese aminokyselinových zbytků N-terminálního oktapeptidu SPM proteinu FrpC	- 93 -
6.1.1.4.1 Štěpení SPM proteinů nesoucích mutace N-terminálního oktapeptidu SPM proteinu FrpC	- 94 -
6.2 Příprava a vakcinační využití rekombinantních antigenů bakterie <i>A. pleuropneumoniae</i>	- 95 -
6.2.1 Příprava vybraných rekombinantních proteinů <i>A. pleuropneumoniae</i>	- 95 -
6.2.1.1 Příprava rekombinantních antigenů rApxI-IVA, rTbpB a rApfA	- 96 -
6.2.2 Příprava a titrace hyperimunních myších sér	- 98 -
6.2.2.1 Optimalizace ELISA pro stanovení rApx proteinů	- 101 -
6.2.3 Testování účinnosti experimentální vakcíny proti prasečí pleuropneumonii	- 101 -
6.2.3.1 Imunizace prasat a sledování tvorby protilátek proti jednotlivým antigenům pro optimalizaci vakcinačního schématu	- 101 -
6.2.3.2 Stanovení LD ₅₀ <i>A. pleuropneumoniae</i> serotyp 9 pro prasata	- 102 -
6.2.3.3 Protektivní účinnost experimentální vakcíny proti infekci LD ₅₀ <i>A. pleuropneumoniae</i> serotypu 9	- 103 -
7 DISKUSE	- 108 -
7.1 Diskuse výsledků studia SPM z bakterie <i>N. meningitidis</i>	- 108 -

7.1.1	SPM doména FrpC jako součást systému umožňujícího afinitní purifikaci rozpustných rekombinantních proteinů.....	- 108 -
7.1.2	Strukturní analýza SPM domény FrpC.....	- 111 -
7.2	<i>Diskuse účinnosti nově vyvinuté rekombinantní vakcíny proti aktinobacilové pleuropneumonii ...</i>	- 112 -
8	ZÁVĚRY.....	- 118 -
8.1	<i>Studium mechanismu autokatalytického štěpení RTX proteinu FrpC bakterie N. meningitidis.....</i>	<i>- 118 -</i>
8.2	<i>Příprava rekombinantních antigenů bakterie A. pleuropneumoniae a jejich využití v experimentální vakcíně proti prasečí pleuropneumonii.....</i>	<i>- 120 -</i>
9	LITERATURA.....	- 123 -
10	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	- 147 -

1 ÚVOD

Označení RTX (Repeat in ToXin) spojuje početnou a stále se rozrůstající skupinu proteinů rozličných funkcí. Pro všechny její členy, mezi něž se řadí například toxiny, metaloproteasy, lipasy, proteiny S-vrstvy, bakteriociny a proteiny s dosud neobjasněnou funkcí, jsou typické následující charakteristiky: i) přítomnost nonapeptidové a na glycin bohaté vápník-vazebné konsensus sekvence GGXGXDX[L/I/V/W/Y/F]X (kde X může být jakýkoliv aminokyselinový zbytek) v různém počtu opakování (6-50) v C-koncové části proteinu; ii) k sekreci proteinu z buňky dochází bez přítomnosti periplasmatického intermediátu mechanismem zahrnujícím rozpoznání C-koncového sekrečního signálu proteiny asociovanými s cytoplasmatickou membránou, které následně exportují protein do kanálu procházejícího skrze celou bakteriální buněčnou stěnu ven z buňky (sekreční systém typu I); iii) geny pro syntézu strukturního proteinu, jeho aktivaci a sekreci jsou většinou uskupeny v tzv. RTX operonu.

Nejrozsáhlejší skupinu rodiny RTX proteinů tvoří RTX toxiny. Většinou se jedná o proteiny o molekulové hmotnosti mezi 100-200 kDa, posttranslačně modifikované acylací mastnou kyselinou. Acylace je zprostředkována specifickým aktivačním proteinem. Tato posttranslační modifikace je naprosto nezbytná pro aktivaci molekuly toxinu a jeho funkci a umožňuje toxinu přímý kontakt s membránami hostitelských buněk. Ten může proběhnout dvěma popsányými způsoby, jež nutně nemusejí být zcela nezávislé: i) první způsob zahrnuje reverzibilní adsorpci toxinu na povrch buňky, následnou expozici hydrofobních částí a konformační změnu molekuly toxinu, vedoucí k inzerci toxinu do lipidické buněčné membrány a vzniku transmembránového póru; ii) druhý způsob zahrnuje vazbu toxinu na specifický buněčný receptor, konformační změnu a inzerci toxinu do buněčné membrány, vznik póru a následnou internalizaci molekuly toxinu spolu s receptorem procesem endocytózy.

Většina RTX toxinů vykazuje pórotvornou aktivitu. Tvorba pórů v membránách cílových buněk vede k mnohočetné signalizaci a případně následné indukci buněčné smrti (apoptózy či nekrózy), která je závislá na přítomnosti vápenatých iontů.

RTX toxiny jsou produkovány širokým spektrem gramnegativních druhů bakterií z rodů *Neisseria*, *Actinobacillus*, *Bordetella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Moraxella*, *Vibrio* aj. *In vitro* vykazují RTX toxiny převážně cytotoxickou a často též hemolytickou aktivitu vůči velmi různorodému spektru cílových buněk. Z imunologického hlediska jsou RTX toxiny

cenným nástrojem pro vývoj nových imunoprofylaktických preparátů, neboť jsou jedněmi z hlavních faktorů virulence těchto bakterií a v naprosté většině jsou schopné v organismu hostitele vyvolat kaskádu reakcí vedoucí k imunitní odpovědi organismu a tvorbě protilátek. RTX toxiny jsou dále děleny do dvou kategorií v závislosti na jejich specifitě k cílovým buňkám hostitele, na promiskuitní cytolysiny a specifitější leukotoxiny. Je rovněž známo, že RTX toxiny hrají důležitou roli ve specifitě jednotlivých patogenů pro různé hostitelské organismy.

Předkládaná disertační práce je věnována studiu klinicky významných RTX proteinů, a to jak z hlediska biochemického, tak z hlediska možnosti využití těchto proteinů pro imunoprofylaktické očkovací látky.

2 INTRODUCTION

RTX (Repeat in ToXin) superfamily consists of many proteins divided into several groups according to their different functions and characteristics: toxins, metalloproteases, lipases, proteins of the S-layer, bacteriocins and proteins with unknown function. However, all of them can be characterized by the following features: i) they contain tandemly repeated (6-50) nonapeptide glycine-rich calcium-binding consensus sequences GGXGXDX[L/I/V/W/Y/F]X (where X is any amino acid residue) in the C-terminal part of the protein. The presence of these repeats is a *sine qua non* condition for RTX protein family membership; ii) secretion from the cell occurs without a periplasmic intermediate by a mechanism which involves recognition of a signal sequence at the C-terminus of the protein by membrane-associated proteins that export the toxin across a channel spanning the entire bacterial envelope directly to the outside of the cell (Type I Secretion System); iii) the genes for protein synthesis, activation and secretion are mostly grouped together on the chromosome and form *rtx* operons. RTX toxins are the largest protein group of the RTX family. To this group belong mostly the proteins with molecular weight ranging from 100 to 200 kDa, with posttranslational fatty acid acylation mediated by a specific activating protein. Posttranslational modification is crucial for the activation of the toxin and its function, in that it allows close contact of the toxin with the cytoplasmic membrane of host cells. The contact can be realized in two different, but not necessarily independent manners: i) reversible passive adhesion, followed by the exposure of the hydrophobic core of the toxin to the lipidic membrane and formation of a transmembrane pore, accompanied with irreversible conformational change in the toxin structure; ii) binding to the specific receptor and subsequent insertion into cell membrane and eventual internalisation of the toxin by receptor-mediated endocytosis.

Most RTX toxins create pores in the cell membrane of target cells, provoking eventual cell death (apoptosis or necrosis) and they appear to require the presence of calcium ions for cytotoxic activity. The toxins exhibit various modes of action and vary in target cell specificity.

RTX toxins can be further divided into two categories based on their target cell specificity (cytotoxins and leukotoxins). It is also known that they play an important role in specificity of individual pathogens to the various host organisms. RTX toxins are produced by a broad range of Gram-negative bacteria, including the genera of *Neisseria*, *Actinobacillus*,

Bordetella, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Moraxella*, *Vibrio*, etc. *In vitro*, RTX toxins display mainly cytotoxic and often also hemolytic activity. From the immunological point of view, RTX toxins are a valuable immunoprophylactic tool, while being mostly one of the main virulence factors of given pathogenic bacteria and having the ability to induce complex immune responses of the host that also lead to antibody production.

This doctoral thesis is devoted to studies on selected RTX proteins, analyzing their biochemistry of action and use as antigens for immunoprophylactic vaccination.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Interakce mezi patogenem a hostitelem

Infekční proces zahrnuje několik stádií interakce patogena s hostitelem: vstup do hostitelského organismu, šíření z místa vstupu, množení v hostiteli, poškození hostitele přímým působením patogena a/nebo imunitní odpovědí hostitele, výsledek (plné uplatnění patogenity – poškození hostitele; plné uplatnění obranných mechanismů hostitele – vyzdravení; stav vyrovnaní a koexistence - chronické onemocnění, latentní infekce) (Ryan, 2010).

Adheze patogenních mikroorganismů k tkáním hostitele je nezbytným předpokladem pro rozvoj většiny infekčních onemocnění. Mezi nejdůležitější adhezivní molekuly patogenních bakterií patří polysacharidové struktury - lipopolisachridy (LPS) či lipooligosacharidy (LOS), adhezivní amyloidy – curli, extracelulární vlákna (Wolfgang, 2000; Piatek, 2005; Chamot-Rooke, 2007; Vik, 2009), dále pak strukturované fimbrie (pili) (Rudel, 1995a; Rudel, 1995b; Lappann, 2006; Bergsten, 2007; Join-Lambert, 2010; Bian, 2000; Zogaj, 2001; Alteri, 2007), případně pomocné fimbriální proteiny například typu HMW1/HMW2 (Gilsdorf, 1997; Rao, 1999; Kenri, 2004). Terapeutické prostředky zaměřené na přerušení této interakce nabývají v souvislosti se vznikem a šířením antibiotické rezistence stále většího významu (Murray, 2005).

Po vazbě na buňky tkáně hostitele, spouštějí patogenní bakterie sekreci dalších tzv. faktorů virulence (invaziny, internaliziny, toxiny, faktory šíření – proteasy, hyaluronidasa, aj.). Ty jim napomáhají v průniku do cílové buňky. Působením faktorů virulence produkovaných samotnou bakterií a též vlivem aktivace imunitní odpovědi hostitele, tedy účinkem komplementu a produkovaných cytokinů zpravidla dochází ke vzniku zánětu a poškození zasažených tkání. Většina faktorů virulence gramnegativních bakterií má imunogenní vlastnosti. Tato skutečnost umožňuje cíleně vyhledávat takové molekuly a charakterizovat je za účelem jejich využití jakožto antigenů při přípravě vakcín proti konkrétním infekčním chorobám zvířat a člověka.

3.2 RTX Proteiny

3.2.1 RTX TOXINY

RTX toxiny představují různorodou skupinu toxinů, která hraje důležitou roli ve virulenci mnoha gramnegativních bakterií, mezi něž patří například *Escherichia coli*, *Bordetella pertussis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Vibrio cholerae*, *Moraxella bovis* a bakterie čeledi *Pasteurellaceae* (rody: *Mannheimia*, *Pasteurella* a *Aggregatibacter*).

Do skupiny RTX (Repeat in ToXin) toxinů se řadí zpravidla pórtvorné exoproteiny produkované širokým spektrem patogenních gramnegativních bakterií. Označení RTX je odvozeno od výskytu charakteristických a funkčně důležitých Ca^{2+} -vázajících nonapeptidových repetitivních sekvencí bohatých na glycin (zavedl koncept RTX skupiny proteinů, zahrnující proteiny vyznačující se přítomností typických nonapeptidových repetitivních sekvencí – (Welch, 1991)). Mezi jednotlivými RTX proteiny, kterých je známo více než 1000 existuje často značně vysoký stupeň homologie (Chang, 1989; Rycroft, 1991; Bauer, 1996b; Stanley, 1998; Highlander, 2000; Frey, 2002; Thumbikat, 2003; Balashova, 2009; Linhartova, 2010).

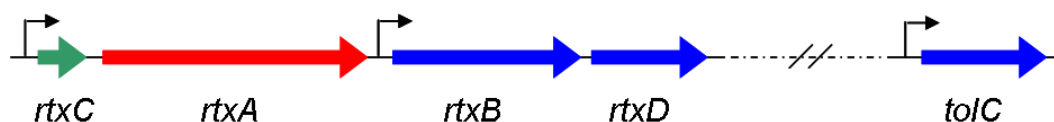
In vitro, RTX toxiny většinou vykazují cytotoxickou a často též hemolytickou aktivitu (Shewen, 1982; Muller, 1983; Gadeberg, 1984; Taichman, 1984; Taichman, 1987; Keane, 1987; Bhakdi, 1989; Strathdee, 1989; Mobley, 1990; Suttorp, 1990; Crosby, 2007). Mnohé z nich jsou exprimovány patogenními druhy z čeledi *Pasteurellaceae* (Frey, 2002). K zástupcům této čeledi patří původci infekčních onemocnění zvířat, rostlin, ale i člověka. I přes svoji značnou různorodost, ať už v patogenезi infekcí, jež způsobují, či ve své specifitě k buňkám a tkáním hostitele, sdílejí všechny RTX toxiny řadu typických vlastností (genetickou organizaci kódujících lokusů, strukturní a funkční charakteristiky, a v neposlední řadě též konečný efekt na cílové buňky hostitelských tkání). Těmi se odlišují od ostatních bakteriálních exoproteinů. Bylo ukázáno, že právě RTX toxiny hrají důležitou roli ve specifitě jednotlivých bakterií k určitým hostitelským organismům (Forestier, 1991; Coote, 1992).

Genetickou analýzou RTX toxinů různých druhů z rodiny *Pasteurellaceae* a několika dalších druhů gramnegativních bakterií byla prokázána existence horizontálního přenosu genů kódujících RTX toxiny, což poukazuje na možnost původu jejich genetického materiálu právě u členů čeledi *Pasteurellaceae* (Frey, 2002).

Působení RTX toxinů na buňky hostitelských tkání může vést až k indukci buněčné smrti (apoptózy či nekrózy), přičemž detailní mechanismus vedoucí ke spuštění těchto buněčných procesů je stále předmětem výzkumu. Úloha RTX toxinů v patogenitě

jednotlivých bakteriálních druhů a jejich schopnost aktivovat imunitní systém hostitelského organismu byla poměrně důkladně popsána. Přítomnost neutralizačních protilátek hostitele vede k výraznému snížení cytotoxické aktivity RTX toxinů, a takové protilátky tedy představují neocenitelný nástroj pro imunoprophylaxi. Bylo ukázáno, že RTX toxiny jsou jedněmi z hlavních faktorů virulence bakterií, jimiž jsou produkovány. Tato skupina zahrnuje cytotoxiny, které podle specifity k cílovým buňkám rozdělujeme na hemolysiny schopné lysovat různé typy eukaryotních buněk včetně erytrocytů a leukotoxiny, jejichž cílová specifita je omezena (Menestrina, 1994). Například α -hemolysin HlyA bakterie *E. coli* je cytotoxický pro širokou škálu buněk, působí na erytrocyty, granulocyty, monocyty a endoteliální buňky (Coote, 1992), (Welch, 1992). Naproti tomu například leukotoxiny bakterie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (LtxA) a *Pasteurella haemolytica* (LktA) jsou toxické pouze pro omezenou druhově specifickou skupinu buněk (Shewen, 1982; Taichman, 1984; Strathdee, 1989). Nedávno byla též objevena nová skupina RTX toxinů, tzv. MARTX – Multiple Activity RTX proteiny. Jejím nejlépe prostudovaným zástupcem je RtxA – 4500 aminokyselinových zbytků dlouhý protein z bakterie *V. cholerae*, který způsobuje depolymerizaci F-aktinových vláken mnoha typů buněk (Fullner, 2000).

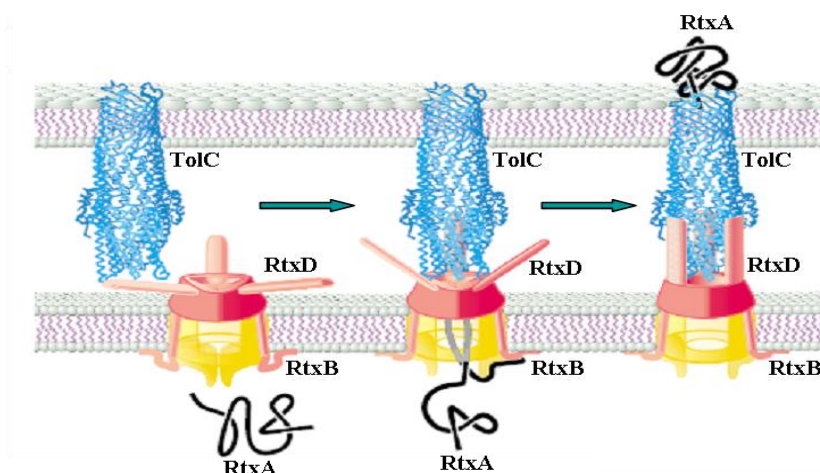
Operon většiny RTX toxinů je tvořen čtyřmi strukturními geny, které jsou uspořádány v pořadí *rtxC*, *rtxA*, *rtxB* a *rtxD* (Obr. 1). Translací genu *rtxA* vzniká inaktivní toxin, tzv. protoxin, který je aktivován posttranslační modifikací zbytkem mastné kyseliny (Ludwig, 1996). Tuto modifikaci zajišťuje produkt genu *rtxC*. Produkty genů *rtxB* a *rtxD* jsou specifickými složkami transportního systému pro daný toxin – ABC protein a adaptorový protein daného ABC transportéru. Gen, který kóduje složku vnější membrány sekrečního aparátu (*tolC*), zpravidla vytváří samostatnou transkripční jednotku na jiném místě bakteriálního chromosomu (Lally, 1999). TolC je součástí několika různých transportních systémů.



Obr. 1: **Schematické znázornění obecného *rtx* lokusu.** Silné barevné šipky znázorňují geny nezbytné pro syntezu (červeně), aktivaci (zeleně) a sekreci (modře) RTX toxinů. Tenké šipky představují promotor.

RTX toxiny jsou transportovány z cytoplazmy na buněčný povrch pomocí sekrečního systému typu I, který se skládá z proteinů RtxB, RtxD a RtxE, proteinu podobnému TolC.

Protein RtxB je ATPasa patřící do rodiny ABC (ATP-Binding Cassette) transportních proteinů (Higgins, 1992; Holland, 1999; Saurin, 1999). V N-koncové části proteinu je lokalizováno osm hydrofobních transmembránových α -helixů, kterými je RtxB zakotven ve vnitřní membráně, C-koncová část RtxB se nachází v cytoplasmě a zprostředkovává vazbu a hydrolysu ATP, čímž poskytuje energii pro export a možná i pro tvorbu počátečního kanálu přes vnitřní membránu (Wang, 1991), (Gentschev, 1992). Protein RtxD patří do rodiny tzv. MFP (Membrane Fusion Protein) proteinů a vytváří velkou periplasmatickou doménu, pomocí které umožňuje translokase reversibilně interagovat s trimerním proteinem TolC vnější membrány a tím také tvorbu transperiplasmatického kanálu (Obr. 2) (Dinh, 1994). Sekreční systém typu I rozpoznává neodštěpitelný sekreční signál o přibližné délce šedesáti aminokyselinových zbytků nacházející se na samotném C-konci RtxA.



Obr. 2: **Model mechanismu sekrece RTX toxinu pomocí RtxBD/TolC aparátu.** Kanálotvorný protein TolC zanořený do vnější membrány v klidovém stavu neinteraguje s membránovým proteinem RtxD a ABC transportérem RtxB. RtxD a RtxB tvoří stabilní komplex ve vnitřní membráně. Rozeznání sekretovaného proteinu RtxA pomocí RtxB ve spolupráci s RtxD indukuje konformační změny v periplasmatické doméně RtxD a asociaci s kanálotvorným proteinem TolC. Je vytvořen transperiplasmatický kanál, který umožní export RtxA. Po ukončení procesu sekrece se proteiny RtxBD/TolC aparátu opět vracejí do odděleného klidového stavu (Koronakis, 2001).

Export proteinu probíhá v jednom energeticky spřaženém kroku, toxin je přenesen na buněčný povrch přes vnitřní i vnější membránu a zde zaujímá svou nativní konformaci. Tento relativně jednoduchý sekreční aparát je schopen přenášet na povrch buňky polypeptidy o molekulární hmotnosti až 800 kDa během několika sekund (Holland, 2005).

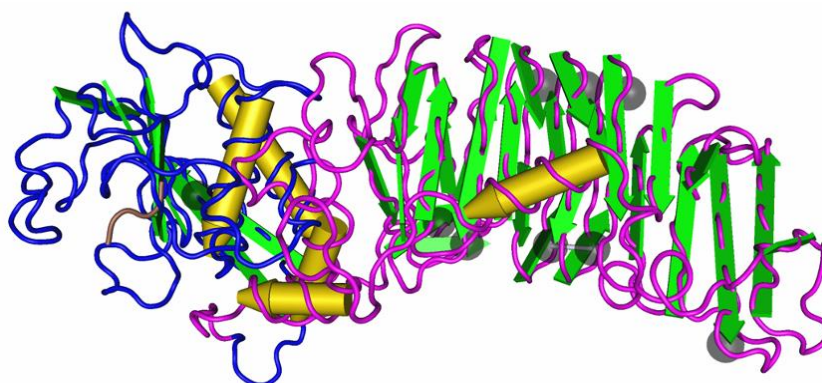
RTX toxiny potřebují pro svou aktivitu vápenaté ionty (Hewlett, 1991). Ty se váží do nonapeptidových repetitivních sekvencí v C-koncové části toxinu (Ludwig, 1988; Rose, 1995;

Rhodes, 2001) a indukují konformační změnu nezbytnou pro plnou funkci proteinu. Trojrozměrná struktura alkalické proteasy bakterie *P. aeruginosa* (Obr. 3) ukázala, že tyto repetitivní sekvence tvoří zcela novou vápník-vazebnou strukturu, nazývanou β -helix (Baumann, 1993). Prvních šest aminokyselinových zbytků každého motivu tvoří ohyb, do kterého se váží Ca^{2+} ionty, a zbylé tři zbytky tvoří krátký β -list. Takové uspořádání otáček a β -listů vytváří pravotočivý helix paralelních β -listů, kde jeden závit helixu odpovídá dvěma po sobě jdoucím nonapeptidovým motivům. K vazbě vápenatých iontů dochází nejspíše až po sekreci toxinu, protože cytoplasmatická koncentrace Ca^{2+} iontů v bakteriích je velmi nízká, např. v *E. coli* je velmi přísně regulována a udržována na konstantní hladině okolo $0,1 \mu\text{M}$ (Gangola, 1987), což je o tři řády nižší koncentrace, než jaká je potřeba pro plnou aktivitu HlyA *E. coli* (Ostolaza, 1995).

Interakce RTX toxinů s membránami cílových buněk se dá rozdělit do dvou kroků, na vratnou adsorpci a nevratnou inserci do membrány (Bakas, 1996), (Ostolaza, 1997). Pasivní adsorpci RTX toxinů na buněčný povrch je možné vizualizovat (Iwase, 1990). Adsorpce toxinu na buněčnou membránu nemusí být nezbytně následována jeho insercí do membrány a buněčnou lysí. Po inserci do buněčné membrány prochází toxin nevratnou konformační změnou spojenou s inzercí do membrány (Moayeri, 1997), po které je možno jej uvolnit pouze za použití detergentu (Bhakdi, 1986). RTX toxiny tvoří kation-selektivní póry definované velikostí a krátkým poločasem života (pouze několik sekund – asociační-disociační rovnováha) (Menestrina, 1987; Benz, 1989; Benz, 1994; Szabo, 1994; Lear, 1995; Maier, 1996; Menestrina, 1996).

Například v případě CyaA bakterie *B. pertussis* je známo, že po vazbě na integrinový receptor $\alpha_{\text{M}}\beta_2$ (CD11b/CD18) cílové buňky hostitele (Guermonprez, 2001) dochází k inserci toxinu do membrány a následné translokaci N-koncové AC domény do cytosolu cílové buňky (Bellalou, 1990; Iwaki, 1995). Vlastní translokace je umožněna existencí negativního membránového potenciálu cílové buňky (Otero, 1995). Bylo též ukázáno, že během translokace AC domény do cytosolu hostitelské buňky dochází v membráně buňky k tvorbě nového typu kation-selektivního póru umožňujícího vstup vápenatých iontů do buňky (Fiser, 2009) a zároveň únik draselných iontů z buňky. Vstup vápenatých iontů vede k aktivaci štěpení talinu kalpainem a následnému přesunu komplexu CyaA s CD11b/CD18 do lipidových raftů, kde přítomnost na cholesterol bohatého prostředí membrány usnadní translokaci AC domény skrze cytoplasmatickou membránu (Bumba, 2010). Navíc se zdá, že translokace AC domény a oligomerizace toxinu při tvorbě kation-selektivního póru umožňujícího únik draselných iontů reprezentují dvě nezávislé aktivity CyaA v membráně

cílové buňky (Osickova, 1999; Osickova, 2010; Basler, 2006; Hewlett, 2006; Basler, 2007; Fiser, 2007; Vojtova-Vodolanova, 2009).



Obr. 3: **3D-struktura alkalické proteasy bakterie *P. aeruginosa*.** Uspořádání po sobě jdoucích otáček a β -listů (zeleně) RTX domény (růžově) vytváří pravotočivý helix paralelních β -listů nazývaný paralelní β -helix, který umožňuje vazbu vápenatých iontů (černé koule). Modře je znázorněna katalytická doména a žlutě α -helixy (Baumann, 1993).

Zda je tvorba pórů závislá na oligomerizaci RTX proteinů, není zatím jasné. Přestože byly RTX toxiny izolovány z membrán pouze jako monomery (Menestrina, 1987; Eberspacher, 1989; Stanley, 1993), analýza odpovědi závislé na dávce RTX toxinu naznačuje, že lyse cílových buněk je vysoce kooperativní děj, který pravděpodobně zahrnuje oligomerizaci toxinu (Bhakdi, 1989; Cavalieri, 1982; Simpson, 1988; Taichman, 1991; Bauer, 1996a; Ludwig, 1993; Iwaki, 1995). Tuto teorii podporuje i pozorování komplementace neaktivních delečních variant CyaA (Iwaki, 1995), a též přímý průkaz oligomerizace CyaA při tvorbě kation-selektivních pórů v membráně cílových buněk (Vojtova-Vodolanova, 2009).

Pro interakce RTX toxinů s povrchovými receptory cílových buněk je zcela nezbytná posttranslační modifikace mastnou kyselinou, která vede k modulaci oligomerizace RTX toxinu a je esenciální pro produktivní vazbu k receptorům cílových buněk, která je iniciálním krokem cytotoxické aktivity toxinu (Sun, 1999; El-Azami-El-Idrissi, 2003; Thumbikat, 2003; Masin, 2005).

Výsledky z nedávné doby ukazují, že CyaA *B. pertussis*, HlyA *E. coli* a LtxA *P. haemolytica* vykazují též slabou lektinovou aktivitu a jsou schopny rozpoznat a navázat N-oligosacharidy na β_2 -integrinových receptorech (Morova, 2008). Zde tedy vyvstává možnost, že by prvotní nesaturovatelná vazba RTX cytotoxinů k rozličným typům buněk mohla probíhat skrze rozpoznávání a vazbu glykosylovaných membránových komponent, například glykoproteinů a gangliosidů.

3.2.2 RTX PROTEINY S NEZNÁMOU FUNKCÍ

V roce 1993 byly u bakterie *Neisseria meningitidis* objeveny dva částečně homologní, po genetické stránce vysoce konzervované proteiny, FrpA a FrpC, mající ve své C-koncové části charakteristickou nonapeptidovou repetitivní doménu typickou pro RTX proteiny (Thompson, 1993c; Thompson, 1993a). Zkratka Frp pochází z anglického Fe-regulated protein, tedy železem-regulovaný protein, neboť k expresi těchto proteinů dochází v prostředí s omezenou dostupností volného železa (např. lidské tělní tekutiny).

Výhradním hostitelem *N. meningitidis* je člověk, u nějž tato bakterie zpravidla asymptomaticky kolonizuje sliznici nosohltanu. Příležitostně, pravděpodobně u jedinců vystavených působení stresových faktorů (únava, podvýživa, imunosuprese, nedostatečná zralost imunitního systému apod.) může *N. meningitidis* způsobovat závažné život-ohrožující meningitidy. U pacientů po prodělané meningeální sepsi způsobené *N. meningitidis* nacházíme vysoké hladiny sérových protilátek cílených právě proti zmíněným dvěma proteinům (Osicka, 2001). Tato skutečnost poukazuje na roli Frp proteinů v patogenezi meningokokového onemocnění, či v umožnění přežívání *N. meningitidis* v organismu člověka. Biologická aktivita těchto proteinů však stále zůstává neobjasněna (Osicka, 2001).

Polymorfismus *frp* alel u meningokoků je příčinou produkce širokého spektra různých variant proteinů sdílejících rozsáhlé úseky identických sekvencí, avšak lišících se v počtu C-koncových RTX repetitivních bloků a/nebo naopak v inzercích/delecích různých částí sekvencí v N-koncové části proteinu (Osicka, 2001). Pro příklad uveďme 122 kDa FrpA protein se 13 kopiemi nonapeptidových repetitivních bloků a na druhé straně FrpC protein se 43 kopiemi a 198 kDa. N-koncových 293 aminokyselinových zbytků FrpA nesdílí žádnou homologii se 407 N-koncovými zbytky FrpC, a to zřejmě z důvodu inserce cizorodé DNA na 5' konec genu *frpA* (Thompson, 1993a; Parkhill, 2000; Tettelin, 2000).

FrpA ani FrpC však nejsou jedinými RTX proteiny, jejichž funkce zůstává neobjasněna. Mezi další patří například ApxIVA produkovaný bakterií *Actinobacillus pleuropneumoniae* – původce prasečí pleuropneumonie (Schaller, 1999), STY2875 protein *Salmonella enterica* serovar *typhi* CT18 (Parkhill, 2001), Sap protein *Caulobacter crescentus* (Umelo-Njaka, 2002), RSIPO_04916 u *Ralstonia solanacearum* (Stevens, 2010), RTX-příbuzný protein bakterie *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718, BcrA protein *Burkholderia cenocepacia* J2315 (Whitby, 2006), Sinorhizobium meliloti, Sll1951 protein *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 (Sakiyama, 2006), a další RTX proteiny u *Xylella fastidiosa* (Simpson, 2000), predikované RTX proteiny různých druhů mořských zástupců čeledí - *Microcystis* sp., *Nostoc* sp. *Hahella* sp. (Kaneko, 2007; Cao, 2005; Jeong, 2005) a další.

Zejména díky narůstajícím možnostem moderních sekvenátorů a následných analýz, je nalézán stále větší počet *rtx* genů, kterými jsou tyto proteiny kódovány. Mnohdy zůstává pouze u nalezení genů se sekvenční homologií s geny RTX lokusu, či jde o predikované proteiny, jejichž exprese nebyla doposud prokázána. Nicméně je zřejmé, že RTX proteiny hrají významnou úlohu v životním cyklu mnoha bakterií a to na řadě různých a často velmi odlišných úrovní.

3.3 *Neisseria meningitidis*

Bakterie *Neisseria meningitidis* (meningokok), je původcem meningokokové meningitidy a fulminantní sepse. Jedná se o gramnegativního diplokok, jehož výhradním hostitelem je člověk. Jak již bylo uvedeno výše, meningokok disponuje mechanismy, jež mu umožňují kolonizaci lidského nosohltanu, aniž by tento stav nutně vedl ke vzniku infekčního onemocnění. Nicméně obecně je známo prokazatelné asymptomatické nosičství u většiny případů meningeálních septik (Mola, 2008; Wetzler, 2010).

Bakteriální meningitida (zánět mozkových obalů - meningů) je považována za hlavní druh infekcí centrální nervové soustavy (CNS). Přestože může být zapříčiněna též rozšířením kontaktních infekcí, jakými jsou například sinusitidy či mastoiditidy, do oblasti meningů, ve většině případů bakteriálních meningitid je původcem patogen šířící se krevním řečištěm. Hematoencefalická bariéra mezi krví a mozkem poskytuje CNS ochranu proti významné části bakterií, které jsou schopné dosáhnout krevního řečiště a dále se jím šířit. Tímto se okruh bakterií, jež mohou být původcem bakteriální meningitidy značně zužuje na několik málo a to zejména extracelulárních patogenů: *Escherichia coli* K1 a *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* skupina B) u novorozenců, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* typ b a *Streptococcus pneumoniae* u dětí a dospělých (Huang, 2000; Pong, 1999; van de Beek, 2006). Paradoxně, mohou být právě tyto bakterie součástí normální mikroflóry oblasti nosohltanu (*N. meningitidis*, *S. pneumoniae* a *H. influenzae*) či zažívacího traktu (*E. coli* a *S. agalactiae*) (Nassif, 2002).

Meningitidy vyvolané *N. meningitidis* mají jako jediný typ bakteriálních meningitid epidemický charakter. Infekce způsobené *N. meningitidis* se vyznačují dualitou mezi velmi častým (průměrně 1/10 světové populace) asymptomatickým nosičstvím (sliznice nosohltanu), či naopak příležitostnými, avšak život ohrožujícími stavy. Incidence meningokokového onemocnění se pohybuje mezi jedním a padesáti případy na 100 000 obyvatel. Úmrtnost činí průměrně 10 %, avšak až 20 % přeživších vykazuje trvalé následky různého charakteru (van Deuren, 2000). Zatímco v průmyslově rozvinutých zemích se

objevují případy onemocnění způsobených meningokokem pouze sporadicky, v oblasti Subsaharské Afriky (v pásu táhnoucím se od Senegalu až po Etiopii) se periodicky vyskytují rozsáhlé epidemie s fatálními následky vzhledem k naprosto nedostatečné úrovni lékařské péče.

Bakteriální (tzv. hnisavá) meningitida je charakteristická velmi rychlým nástupem (50 % pacientů: anamnéza < 24 hod.) projevujícím se zejména vysokou horečkou, úpornými bolestmi hlavy, zvracením, svalovými křečemi a později petechiálním exantémem. V konečném stádiu pacient ztrácí vědomí v důsledku obrny hlavových nervů. K plnému rozvoji onemocnění dochází již v průběhu několika hodin vzhledem k omezenému prostupu složek imunitního systému skrze hematoencefalickou bariéru. Bez okamžitého terapeutického zásahu, spočívajícího v podání vysokých dávek antibiotik (penicilin G, ampicilin, cefalosporiny) a kortikoidů, téměř ve všech případech končí meningitida smrtí. Zvýšené riziko meningokokového onemocnění je především u dětí mladších 2 let a dospívajících.

Přestože včasná terapie meningokokového onemocnění výrazně snižuje riziko úmrtí, účinná prevence ve formě vakcinace se zdá být žádoucí. V současné době jsou meningokokové vakcíny dostupné ve dvou formách, polysacharidové a konjugované. Polysacharidová vakcína nevyvolává aktivaci T-buněk imunitního systému (a tedy imunologickou paměť), ale stimuluje zralé B-lymfocyty k produkci protilátek. Konjugovaná vakcína obsahuje kovalentně vázaný polysacharid k proteinovému nosiči a má za následek stimulaci T-buněk, a tedy dlouhotrvající imunitu. Jak tetravalentní polysacharidová vakcína (obsahuje polysacharidové antigeny skupin A, C, Y a W-135), tak i konjugovaná vakcína (A + C) jsou poměrně účinnou ochranou proti meningokokovému onemocnění (Patel, 2005). Účinnost tetravalentní polysacharidové vakcíny je pro skupiny A a C u školních dětí a dospělých až 85 % a na trhu se již objevila a uspokojivé výsledky přinesla i tetravalentní vakcína (A, C, Y, W-135) konjugovaná s difterickým toxoidem. Protektivní účinek vůči jedné séro skupině však nijak nezajišťuje ochranu vůči séro skupině jiné (Kimmel, 2002).

3.3.1 PATOGENICITA A FAKTORY VIRULENCE BAKTERIE *NEISSERIA MENINGITIDIS*

Mezi hlavní faktory virulence produkované meningokokem patří zejména adheziny, zprostředkovávající kontakt bakterie s cílovými buňkami. V expresi těchto adhezivních molekul existuje hierarchie regulovaná tzv. fázovou variací (tj. modulací exprese jednotlivých adhezínů na úrovni DNA), která vyplývá z různých požadavků na bakteriální fenotyp v závislosti na nise, v níž se meningokok vyskytuje (Kawula, 1988; Sarkari, 1994). V poslední době byla u *N. meningitidis* identifikována celá řada nových adhezivních molekul,

nicméně ke klinicky nejvýznamnějším náleží polymerní pili, opacitní proteiny vnější membrány (Opa, Opc) a kapsule (Stephens, 1981; Virji, 1991; Virji, 1993; Nassif, 1994; de Vries, 1998). Je zajímavé, že mnohé mukozální izoláty *N. meningitidis* kapsulární geny postrádají (Claus, 2002; Dolan-Livengood, 2003; Weber, 2006). Nicméně je to právě kapsulární fenotyp, jenž umožňuje meningokokovi přežít v krevním řečišti. Kapsule do určité míry maskuje svou přítomností některé jiné adhezivní molekuly na povrchu vnější membrány a k primárnímu kontaktu bakterie s mukozálními epiteliálními buňkami hostitele dochází tedy zejména díky polymerním pili, jež jsou schopny skrze kapsuli procházet (Virji, 1992; Virji, 1993; Virji, 1995; Griffiths, 2007).

Pili typu IV (Tfp) jsou přítomny na povrchu velkého počtu různých gramnegativních bakterií. Pili jsou důležité z hlediska přežívání bakterií na úkor nepiliováných kmenů a druhů, a také z hlediska DNA transformace – schopnosti bakterií pohlcovat cizorodou DNA a zvyšovat svoji genetickou adaptabilitu a virulenci (Merz, 2000). Tfp mají schopnost retrakce (zpětného vtažení do buněk, ze kterých pocházejí) díky energii-generující PilT ATPase (Merz, 2000; Skerker, 2001). Schopnost retrakce pili je esenciální pro pohyblivost bakterie a pilus-dependentní signalizaci buňkám hostitelských tkání (Lee, 2005)..

Názvu „opacitní“ bylo poprvé užito pro proteiny exprimované na povrchu *N. gonorrhoeae*, propůjčující této bakterii za určitého osvětlení specifický druh odlesku (Swanson, 1978). U meningokoka lze tento odlesk pozorovat pouze u akapsulárních fenotypů (Virji, 1992). Oba proteiny (Opa i Opc) mají schopnost vázat nejméně dvě z běžných negativně nabitých buněčných povrchových molekul: heparan sulfátové proteoglykany (HSPG) a sialové kyseliny (Achtman, 1988; de Vries, 1998; Moore, 2005).

Opa proteiny jsou transmembránové struktury tvořené osmi β -barely. Ty jsou spojeny čtyřmi na povrch bakterie exponovanými, většinou sekvenčně značně variabilními, smyčkami. Repertoár Opa struktur je kromě podílu daného antigenu a fázovou variací do určité míry navýšen v důsledku intra- a intergenomické rekombinace (Hobbs, 1998). I přes tuto skutečnost bylo ukázáno, že vysokou prevalencí disponují pouze určité typy Opa struktur, což je pravděpodobně výsledkem imunologické selekce a schopností těchto vybraných Opa proteinů interagovat s receptory na cílových buňkách hostitele (např. CAECAM - carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules, skupina imunoglobulinových receptorů exprimovaných na povrchu buněk většiny tkání) a tím zvyšovat přežívání bakterie v hostiteli (Callaghan, 2006; Callaghan, 2008b; Callaghan, 2008a).

Opc byl prvním vykrystalizovaným proteinem meningokoka (Prince, 2002). Na rozdíl od Opa je zde přítomno deset β -barelů propojených pěti na povrch exponovanými smyčkami,

kódovaných však pouze jediným genem (Achtman, 1988; Olyhoek, 1991; Zhu, 1999). Opc jsou vysoce imunogenní (Rosenqvist, 1993), mají schopnost přímo interagovat s proteiny extracelulární matrix (ECM) jako jsou vitronektin a fibronektin a aktivovat endoteliální integrinové receptory $\alpha_v\beta_3$ (vitronektinový receptor) a $\alpha_5\beta_1$ (fibronektinový receptor) (Virji, 1994; de Vries, 1998; Prince, 2002; Unkmeir, 2002a). Bylo též ukázáno, že Opc proteiny, produkováné intracelulárně se vyskytujícími meningokoky, interagují s cytoskeletálním α -aktininem obsaženým v endoteliálních buňkách. To jim umožňuje modulovat kaskádu reakcí vedoucí k reorganizaci buněčného cytoskeletu a změně v signalizačních drahách, jež jsou na něj napojeny (Seiler, 1996; Otey, 2004). Exprese Opc proteinů nebyla doposud prokázána u *N. gonorrhoeae* a u některých klonálních linií *N. meningitidis*, např. ET37 (Seiler, 1996). Není bez zajímavosti, že právě kmeny náležející do skupiny označené jako ET37 mají tendenci způsobovat těžké septikémie, v mnohých případech dokonce bez rozvinutí příznaků typických pro meningokokovou meningitidu (Whalen, 1995; Kriz, 1995; Unkmeir, 2002b). Je tedy možné, že se Opc určitým způsobem podílí na schopnosti *N. meningitidis* způsobovat meningitidy (Unkmeir, 2002b). Díky své vysoké imunogenitě a malé heterogenitě mezi jednotlivými kmeny *N. meningitidis* by mohly být Opc dobrým kandidátem pro vývoj zcela nového druhu vakcíny. Do určité míry limitující se však v tomto směru stává úroveň hladiny exprese Opc, která je velmi variabilní.

Mezi nedávno identifikované adhezivní a jim příbuzné molekuly přispívající k patogenicitě meningokoka patří např. NhhA (Neisseria hia homolog A) a App (Adhesion and penetration protein). Tyto proteiny jsou mezi jednotlivými kmeny *N. meningitidis* velmi rozšířené a vykazují vysoký stupeň homologie s autotransportéry Hsf/Hia a Hap exprimovanými *H. influenzae* (Scarselli, 2006). Dalším nově popsáným proteinem je NadA (Neisserial adhezin A), adhezin, který je produkováný třemi ze čtyř hypervirulentních kmenů *N. meningitidis* (Comanducci, 2004). Mutace v genu kódujícím NadA má za následek dramatické snížení schopnosti adheze k epiteliálním buňkám. NadA je taktéž silně imunogenní, stimuluje tvorbu baktericidních protilátek a jeví se jako potenciální kandidát pro vývoj vakcíny proti meningokokovi skupiny B (Comanducci, 2004; Ciabattini, 2008).

3.3.2 KOLONIZACE HOSTITELE A IMUNITNÍ ODPOVĚĎ

Z patofyziologie meningokokové meningitidy je zřejmé, že se jedná o několika-stupňový proces, který odráží schopnost bakterie překročit orofaryngeální bariéru, přežít a pomnožit se v krevním řečišti a eventuálně dosáhnout a proniknout skrze hematoencefalickou

bariéru (krev-mozek/mozkomíšňí mok, Cerebrospinal Fluid - CSF) (Rubin, 1985; Quagliarello, 1992; Nassif, 2002).

Jak již bylo uvedeno v předchozí kapitole, v kolonizaci samotné hrají největší roli proměnlivé a dynamické adhezivní molekuly. Adheziny různého druhu (a to především přítomnost lipooligosacharidu a polysacharidové kapsule) umožňují vlastní kontakt bakterie s epiteliemi hostitele. Navíc přítomnost antigenní a fázové variace těchto povrchových struktur znesnadňuje imunitnímu systému hostitele přítomnost bakterie v organismu vůbec odhalit. Přestože je *N. meningitidis* obecně považována za extracelulární bakterii, *in vitro* studie s lidskými tkáňovými kulturami ukázaly, že je meningokok schopen vstupovat do buněk skrze interakci adhezin-receptor (Virji, 1991; Virji, 1993; Virji, 1995; de Vries, 1998; Jones, 2003; Estabrook, 2004; Griffiths, 2007). Často bývají též pro účely studia interakcí meningokoka s buňkami hostitele používány lidské orgánové sekce. Ty jsou však mnohdy vzhledem k jejich historii stíženy zánětem (např. dětské tonsily po extrakci). Je tedy otázkou, zda právě zánětem narušená rovnováha mezi bakterií a hostitelem není přirozenou podmínkou, která musí být splněna, aby vůbec mohlo dojít k prostupu bakterie do systémové cirkulace, a tedy ke vzniku infekce. Může se ale jednat pouze o únikový mechanismus, jenž umožní bakterii uniknout aktivitě fagocytů, komplementu a/nebo cílené protilátkové odpovědi. Internalizace do buněk poskytuje zároveň přístup k novým zdrojům živin a dává bakterii příležitost interferovat s hostitelským organismem skrze modulaci činnosti součástí vrozené imunity. Ke zvratu a následnému vzniku infekce pak stačí vznik i přechodné imunodeficiency, např. v důsledku působení stresových faktorů, nebo předchozí virová infekce (Stephens, 2009).

Stále narůstá počet záznamů o tom, že invazivní meningokoková onemocnění vedou k rozsáhlým buněčným poškozením, porušení těsných spojení (tight-junctions) mezi buňkami způsobují změny v normální buněčné morfologii a mají za následek ztráty buněk a rozrušení značných oblastí tkání (Klein, 1996; Virji, 1991; Virji, 1992; Virji, 1993; Mercier, 1988; Birkness, 1995; Stephens, 1991). V průběhu prostupu skrze vaskulární endoteliální bariéru a bariéry krev-mozek a krev-CSF dochází k interakci meningokoka s mnohými buněčnými typy a sérovými faktory, a to často s vysokou specificitou (Nassif, 2002). Je tedy velmi pravděpodobné, že faktory zprostředkující kolonizaci, jež je normálním stavem koexistence meningokoka a člověka, umožňují posléze též šíření bakterií v organismu hostitele.

3.3.3 ŽELEZEM-REGULOVANÝ PROTEIN C (FRPC)

Příslušnost Frp proteinů *N. meningitidis* k rodině RTX proteinů naznačuje, že by oba tyto proteiny (FrpA a FrpC) mohly hrát určitou roli v nosičství a/nebo infekcích způsobených *N. meningitidis*. Nicméně například v genomu *N. meningitidis* séro skupiny A, izolátu Z2491 byly nalezeny pouze fragmenty *frp* genů rozptýlené podél chromosomu, avšak ani jediný intaktní *frp* gen (Parkhill, 2000).

Naproti tomu u *N. meningitidis* séro skupiny C, izolátu FAM20 jsou za železem - limitovaných podmínek exprimovány a sekretovány hned dva rozdílné Frp proteiny (Thompson, 1993a; Thompson, 1993b; Thompson, 1993c). Přestože tyto dva proteiny sdílejí rozsáhlé úseky identických sekvencí, liší se v počtu nonapeptidových repetitivních sekvencí a jejich N-koncové domény nevykazují žádné známky homologie se sekvencemi jakéhokoli známého proteinu (Thompson, 1993b; Thompson, 1993c). Zajímavé je, že v N-koncové doméně FrpC byla prokázána přítomnost tzv. RGD (Arg-Gly-Asp) sekvence, u níž bylo v případě jiných proteinů a bakteriálních faktorů virulence ukázáno, že zprostředkovávají vazbu k integrinům buněčných membrán savčích buněk (Leininger, 1991; Leong, 1995).

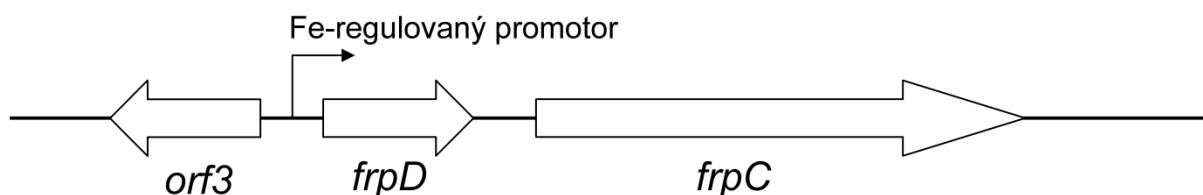
Dalším ze skupiny Frp proteinů je 141 kDa dlouhý FrpC – podobný protein, kódovaný v genomu *N. meningitidis* séro skupiny B, izolátu MC58. Sekvenčně odpovídá zkrácené variantě FrpC, postrádající aminokyselinové zbytky odpovídající pozicím 251 až 377 v N-terminální části a aminokyselinovým zbytkům v pozicích 1319 až 1718 celistvé varianty FrpC izolátu FAM20. Genom MC58 nicméně obsahuje i gen pro variantu FrpC proteinu téměř shodného s FrpC FAM20 (Tettelin, 2000).

Alely *frpC* se vyznačují vysokým stupněm polymorfismu, ale jejich přítomnost byla prokázána na rozdíl od alel *frpA* u všech testovaných klinických izolátů *N. meningitidis* (Osicka, 2001). Navíc bylo ukázáno, že u pacientů, kteří prodělali meningokokové onemocnění vyvolané bakterií *N. meningitidis* je možné detekovat vysoké hladiny protilátek cílených proti FrpC. To je další z výsledků studia Frp proteinů, který poukazuje na možnost jejich podílu v patogenezi meningokokového onemocnění (Osicka, 2001).

3.3.3.1 *Exprese a sekrece FrpC*

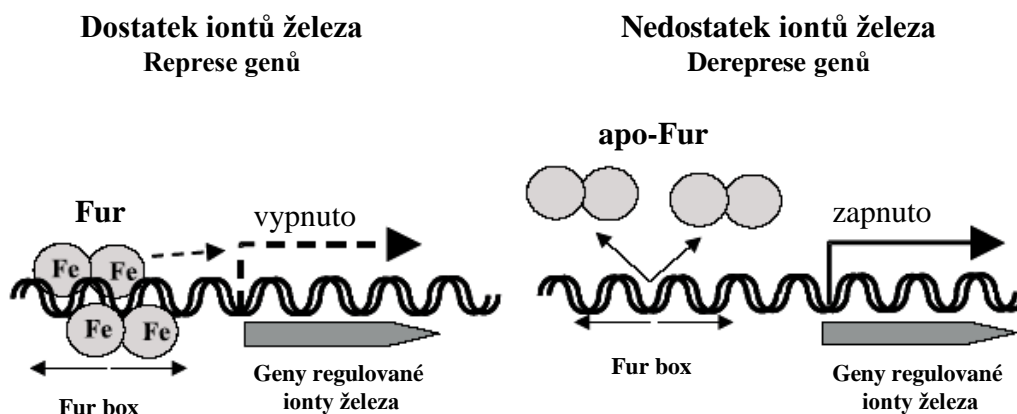
V sekvenované části *frp* lokusu *N. meningitidis* FAM20 se kromě samotného strukturního genu pro FrpC nachází další dva otevřené čtecí rámce (Obr. 4) (Thompson, 1993b). Těsně před genem *frpC* je na stejném DNA vlákně gen *frpD* kódující lipoprotein vnější membrány (Prochazkova, 2005), který nevykazuje signifikantní homologii s žádným z doposud identifikovaných a charakterizovaných proteinů, a jehož biologická funkce je

stejně jako u proteinu FrpC neznámá. Geny *frpD* a *frpC* jsou pravděpodobně přepisovány ze stejného železem-regulovaného promotoru a jsou odděleny pouze 17 nukleotidů dlouhou sekvencí, obsahující konzervované ribosom-vazebné místo genu *frpC*. Poslední otevřený čtecí rámec, *orf3*, se nachází na komplementárním vlákně DNA a kóduje protein o velikosti 24,9 kDa, který je homologní s proteinem IS1016-V₆ bakterie *Haemophilus influenzae* (Dobson, 1992). Geny kódující jednotlivé komponenty sekrečního aparátu typu I nejsou umístěny ve *frp* lokusu nebo jeho blízkosti, ale v jiné části chromosomu (Wooldridge, 2005).



Obr. 4: **Schematické znázornění *frp* lokusu *N. meningitidis* FAM20.** Jednotlivé geny jsou znázorněny silnými šipkami. Tenká šipka znázorňuje železem regulovaný promotor, z něhož jsou pravděpodobně přepisovány geny *frpD* a *frpC* (Thompson, 1993b).

K produkci FrpC proteinu v kultivačním médiu dochází u *N. meningitidis* FAM20 pouze při odstranění iontů železa, tj. za limitace, do které se meningokok dostává při kolonizaci sliznice lidského hostitele (Schryvers, 1999), (Thompson, 1993a; Thompson, 1993c), (Genco, 1996). Před geny *frpD-frpC* byl na základě podobnosti se sekvencemi promotorů *Neisseria* spp. a *E. coli* nalezen promotor nesoucí 16, resp. 18 nukleotidů dlouhou DNA sekvenci pravděpodobného Fur-specifického operátoru (Fur box) (Thompson, 1993a; Thompson, 1993c). Předpokládá se, že k regulaci exprese *frp* genů dochází, stejně jako u jiných železem - regulovaných genů *N. meningitidis* nebo jiných bakterií, prostřednictvím Fur proteinu (Ferric uptake regulator), který zde funguje jako negativní regulátor transkripce (Thomas, 1994), (Genco, 1996), (Panina, 2001). Při nadbytku iontů železa Fur váže jeho dvojmocnou formu a interaguje s Fur-specifickým operátorem genů regulovaných železem a blokuje tak jejich transkripci (Obr. 5). Naopak při nedostatku iontů železa k vazbě Fur proteinu k Fur boxu nedochází a geny mohou být přepisovány.



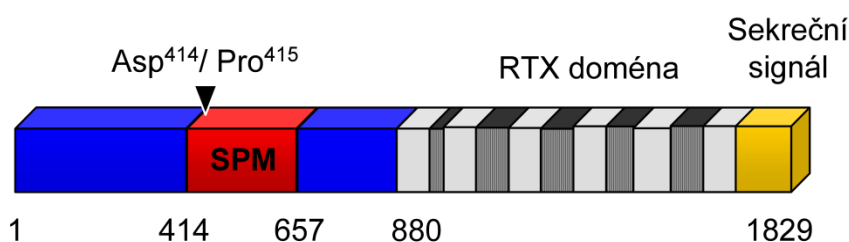
Obr. 5: Schematické znázornění negativní regulace genů prostřednictvím Fur proteinu. Při nadbytku iontů železa dochází k vazbě komplexu Fur proteinu s železnatými ionty k Fur boxu železem regulovaných genů a tím k zablokování jejich transkripce. Opačná situace nastává v případě, že je v prostředí železa nedostatek (Grifantini, 2003; Jackson, 2010).

Všechny RTX proteiny jsou sekretovány sekrečním systémem typu I, který sestává ze tří komponent: z ATP-vázacího proteinu vnitřní membrány (RtxB), kanálového proteinu vnější membrány (RtxE) a membránového periplasmatického proteinu (RtxD), který propojuje oba dva předchozí. Geny kódující proteiny RtxB, RtxD a RtxE jsou u většiny bakterií uspořádány v jednom operonu, popřípadě jsou jako operon organizovány geny pro RtxB a RtxD, přičemž gen pro RtxE je umístěn v jiné části chromosomu. *In silico* mapování genomu *N. meningitidis* séro skupiny B však ukázalo přítomnost sekrečního systému typu I jedinečné organizace. Byly nalezeny geny kódující homology RtxB, RtxD i RtxE, přičemž *rtxB* byl nalezen na chromosomu samostatně a gen *rtxD* v těsném sousedství genu *rtxE* (Wooldridge, 2005).

3.3.3.2 Struktura a funkce proteinu FrpC

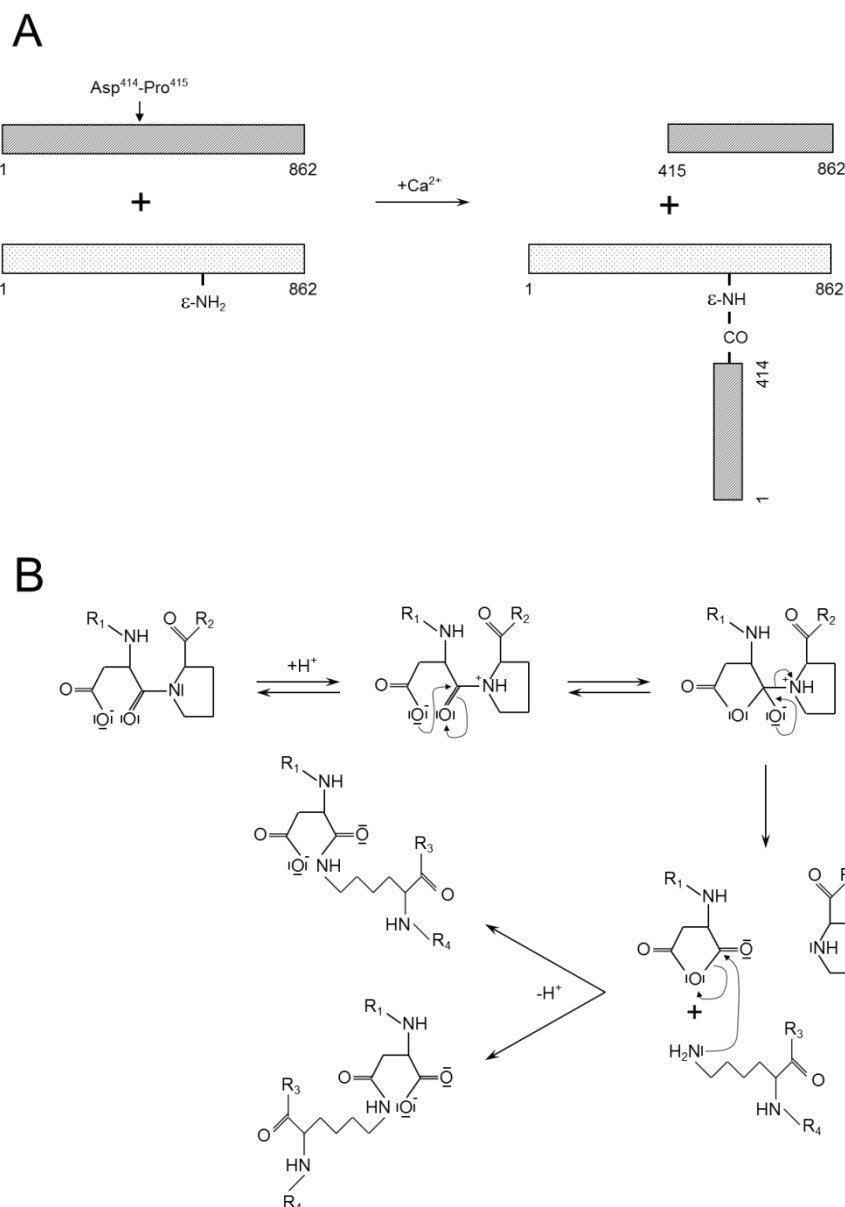
FrpC bakterie *N. meningitidis* izolátu FAM20 je 1829 aminokyselinových zbytků dlouhý protein o relativní molekulové hmotnosti 198 kDa. Ve své C-koncové části nese 43 nonapeptidových repetitivních sekvencí, s charakteristickým konsensus motivem RTX proteinů, které se podílejí na vazbě vápenatých iontů a C-koncový sekreční signál (Obr. 6) (Thompson, 1993b). Sekvence nesoucí aminokyselinové zbytky 1-413 a 658-880 N-koncové části proteinu nevykazují sekvenční homologii s žádným z doposud známých proteinů. Oblast vymezená aminokyselinovými zbytky 414 až 657 je tvořena tzv. samoštěpitelným modulem (SPM, Self-Processing Module), který je zodpovědný za autokatalytické štěpení proteinu FrpC (Osicka, 2004). K tomu dochází mezi aminokyselinovými zbytky Asp⁴¹⁴ a

Pro⁴¹⁵, za vzniku 45-kDa N-koncového a 150-kDa C-koncového fragmentu molekuly FrpC. Štěpení vazby Asp⁴¹⁴/Pro⁴¹⁵ nebylo možné zablokovat žádným z nejběžněji používaných inhibitorů serinových, cysteinových nebo aspartátových proteas, stejně tak jako inhibitorů metalloproteas, což naznačuje, že by k němu mohlo docházet zcela novým mechanismem (Osicka, 2004). Naopak, bodové mutace negativně nabitých aminokyselinových zbytků, potenciálně zapojených do vazby vápenatých iontů (D499K, D510A, D521K a E532A), dramaticky snížily schopnost autokatalytického štěpení proteinu FrpC (Osicka, 2004).



Obr. 6: **Schematické znázornění molekuly FrpC.** N-koncová část proteinu FrpC (modře) nevykazuje žádné známky podobnosti s jakýmkoliv doposud známým proteinem. Nachází se v ní takzvaný samoštěpitelný modul (SPM, zbytky 414 až 657, červeně) nezbytný pro Ca²⁺- dependentní autokatalytické štěpení proteinu FrpC mezi aminokyselinovými zbytky Asp⁴¹⁴ a Pro⁴¹⁵ (Osicka, 2004). V C-koncové části molekuly se nachází repetitivní doména typická pro RTX proteiny (šedě s šrafovanými bloky) a C-koncový sekreční signál (žlutě).

Překvapivě bylo pozorováno, že v důsledku štěpení molekuly FrpC dochází k tvorbě extrémně stabilních vysokomolekulových forem rekombinantního proteinu FrpC. Tyto formy byly rozpoznávány 9D4 anti-RTX monoklonální protilátkou poukazující na přítomnost C-koncové části proteinu FrpC i anti-FLAG protilátkou M2 rozpoznávající aminokyselinovou sekvenci (tzv. FLAG tag) vloženou na N-konec proteinu FrpC. Detailní analýza s použitím hmotové spektrometrie ukázala, že 45 kDa N-koncový fragment proteinu FrpC, vzniklý štěpením vazby Asp⁴¹⁴/Pro⁴¹⁵, se může vázat přes C-terminální aspartátový zbytek k ε-aminoskupině lysinového zbytku jiné molekuly FrpC a vytvářet tak kovalentní isopeptidovou vazbu (Obr. 7) (Osicka, 2004).



Obr. 7: Schéma štěpení molekuly FrpC a následného propojení vzniklého N-koncového fragmentu s druhou molekulou proteinu kovalentní isopeptidovou vazbou. A, schematický model na vápníku závislého štěpení a tvorby vysokomolekulových forem FrpC. Po vazbě vápenatých iontů dochází ke specifickému štěpení molekuly FrpC v místě peptidové vazby mezi Asp⁴¹⁴-Pro⁴¹⁵ a k následné interakci volné karboxy-terminální skupiny uvolněného amino-terminální fragmentu s ϵ -amino skupinou lysinového zbytku jiné molekuly FrpC za vzniku Asp-Lys isopeptidové vazby. B, schematické znázornění možného chemismu štěpení intramolekulární Asp-Pro peptidové vazby a vzniku intermolekulární Asp-Lys isopeptidové vazby (Osicka, 2004).

Sekvence vykazující vysoký stupeň podobnosti se sekvencí SPM proteinu FrpC byly nalezeny také u některých jiných RTX proteinů, které byly objeveny poměrně nedávno a

jejich biologická funkce je stejně jako u proteinu FrpC doposud neznámá (jsou produkovány např. bakteriemi *Actinobacillus pleuropneumonie*, *Xylella fastidiosa* a *Ralstonia solanacearum* (Schaller, 1999; Simpson, 2000; Stevens, 2010). U proteinu ApxIVA bakterie *A. pleuropneumonie* bylo poté skutečně prokázáno, že je stejně jako protein FrpC autokatalyticky štěpen v přítomnosti vápenatých iontů mezi zbytky Asp a Pro, přičemž docházelo i v tomto případě k tvorbě stabilních vysokomolekulových forem proteinu ApxIVA (Osicka, 2004).

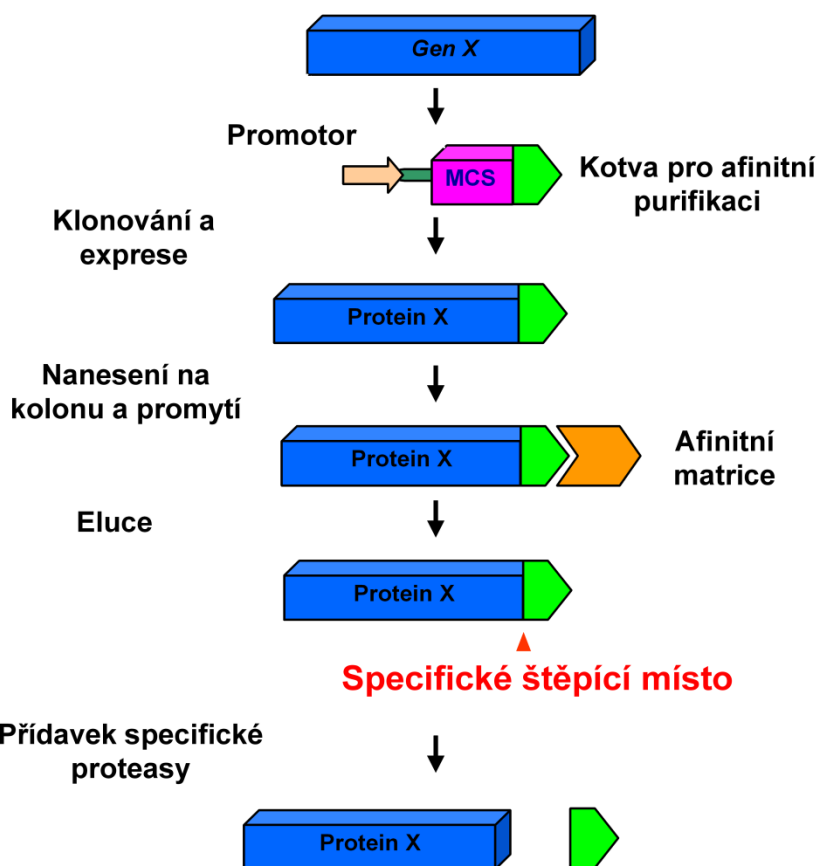
3.3.3.3 Samoštěpitelný modul (SPM) proteinu FrpC

Jak již bylo uvedeno výše, sekvence vykazující vysoký stupeň homologie se sekvencí SPM proteinu FrpC *N. meningitidis* se vyskytují i u další bakteriálních druhů, kolonizujících mnohdy velmi odlišné environmentální niky. Detailním prohledáváním dostupných databází bylo identifikováno na 50 proteinů sdílejících na úrovni aminokyselinové sekvence více než 80% podobnost a více než 50% identitu se sekvencí SPM. Mnohé z nich jsou jen různými variantami určitého proteinu v různých kmenech téhož druhu bakterie. Zajímavé je, že i přesto existuje 11 typů s SPM vysoce homologních sekvencí, které nesou na svém N-konci téměř identický oktapeptidový sekvenční motiv. V případě SPM proteinu FrpC se jedná o sekvenci D₄₁₅PLALDLD. Identická sekvence se vyskytuje na N-konci SPM *A. pleuropneumoniae*, u *Xylella fastidiosa* a *Gallionella capsiferriiformans* nacházíme motiv se záměnou alaninu za valin (DPLVLDLD), u *Hahella chejuensis* a *Acinetobacter* sp. záměnu alaninu za isoleucin (DPLILDLD), u *Nitrococcus mobilis* pak záměnu jednoho z leucinů za valin (DPLAVLDLD). V případě dalších čtyř bakteriálních druhů (*Shewanella violacea*, *Methylobacter mobilis*, *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* a *Geobacter uraniireducens*) vykazuje tato sekvence záměny na dvou či třech pozicích jednotlivých aminokyselinových zbytků. U některých proteinů nesoucích SPM podobné sekvence byla prokázána i jejich biologická funkce. Jedná se např. o RTX toxiny, bakteriociny, adheziny vnější membrány či hemolysinu-podobné vápník-vázající proteiny (Theunissen, 2010; Siddaramappa, 2011). Je tedy možné, že biologická aktivita proteinu FrpC je podobná některé ze jmenovaných.

3.4 Využití samoštěpitelných afinitních kotev pro purifikace rekombinantních proteinů

Jedním z možných přístupů k purifikacím rekombinantních proteinů je užití afinitních kotev určených pro purifikaci na afinitních maticích. Tyto kotvy jsou fúzovány k jedné, popřípadě oběma koncovým částem proteinu a díky jejich afinitě k příslušné matici je možné dosáhnout velmi vysoké čistoty požadovaného proteinu už po jednokrokové purifikaci. Mezi běžně užívané afinitní kotvy patří např. poly-His-, poly-Arg-, c-myc-, FLAG-, S- nebo Strep-tag, chitin-vazebná doména, maltosu-vázající protein nebo glutathion S-transferasa. Nevýhodou systémů založených na všech těchto afinitních kotvách je fakt, že pro některé aplikace (stanovení biologické aktivity, krystalografie, produkce protilátek apod.) musí být afinitní kotva odstraněna. Pro tento účel bývá mezi afinitní kotvu a protein určený k purifikaci vkládán krátký peptid, který je rozpoznáván některým typem vysoce specifické proteasy, což umožňuje po jejím přidavku oddělení požadovaného proteinu od afinitní kotvy (Obr. 8). Tento postup s sebou ale přináší určitá omezení: (i) již jednou vypurifikovaný rekombinantní protein musí být znovu oddělen od odštěpené afinitní kotvy, nedoštěpené formy proteinu a proteasy, což vyžaduje další purifikační krok navíc, (ii) některé užívané proteasy, jako například faktor Xa, enterokinasa nebo trombin nejsou vždy zcela specifické a mohou rozpoznávat a štěpit peptidové vazby i v jiných místech rekombinantního proteinu, (iii) specifické štěpící místo může být v důsledku konformace fúzního proteinu nepřístupné pro štěpení danou proteasou, a (iv) mnohé proteasy mají poměrně dlouhý poločas reakce a jejich pořizovací náklady jsou dosti vysoké.

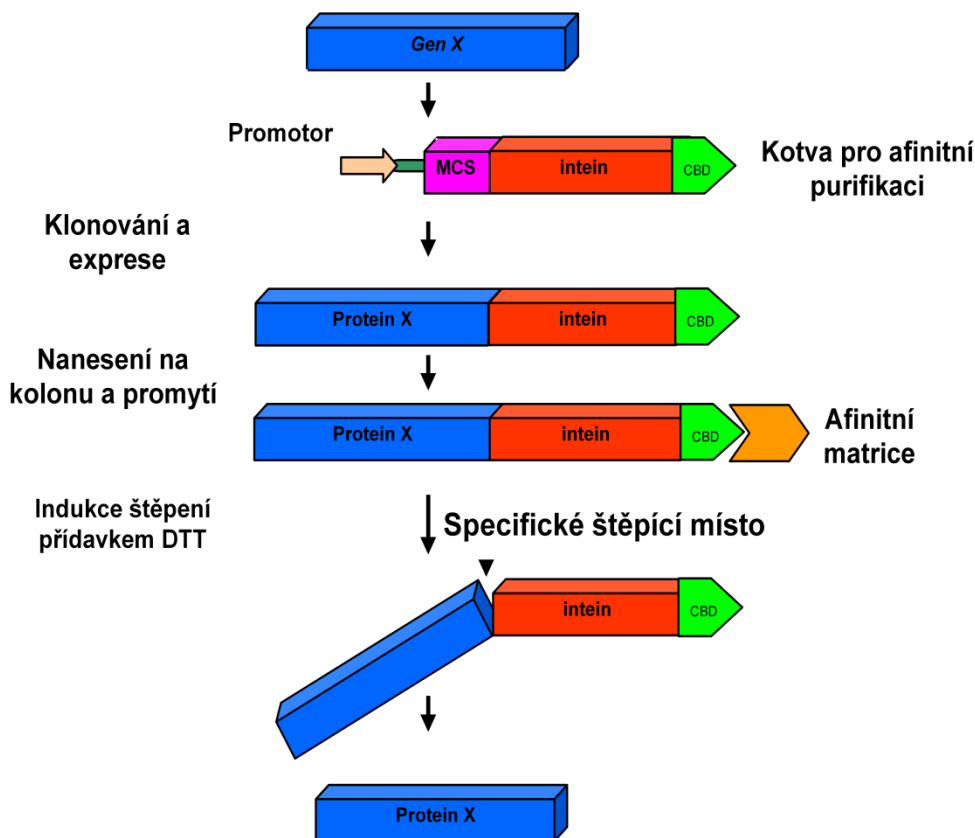
Ve snaze vyhnout se výše uvedeným omezením, byly vyvinuty systémy, v nichž je mezi požadovaný rekombinantní protein a afinitní kotvu vložen tzv. samoštěpitelný modul (Chong, 1997). V případě těchto systémů nedochází ke specifickému štěpení fúzního proteinu přidavkem žádné proteasy, ale přímo samoštěpitelným modulem, který je po aktivaci schopen štěpit peptidovou vazbu mezi požadovaným rekombinantním proteinem a jím samotným. Z toho je zřejmé, že samoštěpitelný modul musí splňovat dva základní předpoklady: (i) štěpí specificky a účinně pouze peptidovou vazbu spojující rekombinantní protein s modulem samotným; (ii) štěpení je indukovatelné, což zajišťuje, že fúzní protein není rozštěpen už v produkčním organismu nebo během přípravy buněčného lyzátu, ale až v příslušném purifikačním kroku. Tyto podmínky značně zužují výběr potenciálních proteinů pro přípravu funkčních samoštěpitelných modulů a v současnosti proto existují pouze dva.



Obr. 8: Schéma typické strategie purifikace rekombinantních proteinů pomocí afinitní chromatografie. Gen pro protein určený k purifikaci je fúzován s DNA sekvencí pro afinitní kotvu a exprimován. Poté je připraven buněčný lyzát, který je nanesen na kolonu s příslušnou afinitní matricí, kde je fúzní protein specificky zachycen, a ostatní kontaminující proteiny jsou odmyty. Fúzní protein je pak eluován a afinitní kotva odštěpena specifickou proteasou. Kotva může být odštěpena také přímo na koloně, přičemž v tomto případě zůstane navázána na matici (v tomto případě bývá ale účinnost štěpení většinou nižší).

Jeden z těchto systémů je založený na modifikovaném VMA inteinu *Saccharomyces cerevisiae*. VMA intein, fúzovaný svým C-koncem k chitin-vázající doméně pocházející z *Bacillus circulans* (Chitin-Binding Domain, CBD) jako afinitní kotvě, je na svém N-konci fúzován s rekombinantním proteinem určeným k purifikaci (Chong, 1997). Během ní je exprimovaný fúzní protein vázán díky CBD kotvě na kolonu s chitinovou matricí, přičemž ostatní kontaminující proteiny jsou odstraněny. Vystavením redukčnímu působení thiolů (např. DTT, β -merkapt ethanol, cystein) je u inteinu aktivována štěpící aktivita a u fúzního proteinu navázaného na matici dochází ke štěpení peptidové vazby mezi inteinem a rekombinantním proteinem, který je následně uvolněn z matrice. Zbytek fúze, intein-CBD, zůstane pevně zachycen na matici a nekontaminuje purifikovaný protein. Tento systém, založený na inteinu, je komerčně dostupný pod názvem "T7 IMPACT (Intein Mediated

Purification with an Affinity Chitin-Binding Tag) System“ od firmy New England Biolabs (Obr. 9). Druhý samoštěpitelný modul využívá katalytického jádra sortasy A bakterie *Staphylococcus aureus*. V tomto případě je sortasa A na N-konci fúzována se šesti histidinovými zbytky, umožňujícími následnou purifikaci celého fúzního proteinu na Ni-NTA agarose, a na C-konci pak s požadovaným rekombinantním proteinem (Mao, 2004). Indukce štěpení fúzního proteinu se v případě sortasy A provádí pomocí vápenatých iontů (Mao, 2004).



Obr. 9: **Schéma purifikace rekombinantních proteinů s využitím samoštěpitelné int-CBD afinitní kotvy.** Protein určený k purifikaci je N-koncovým fúzním partnerem inteinu, který na svém C-konci nese CBD kotvu pro afinitní chromatografii. Po nanesení buněčného lyzátu na kolonu, navázání fúzního proteinu na afinitní matrici a odmytí kontaminujících proteinů je pomocí DTT indukováno štěpení vazby mezi rekombinantním proteinem a fúzí intein-CBD. Nakonec je rekombinantní protein eluován, přičemž intein-CBD zůstává přes afinitní kotvu CBD pevně vázán na matrici.

Jako vhodný kandidát pro výše popsanou aplikaci se jeví i samoštěpitelný modul proteinu FrpC. Jeho využití pro konstrukci samoštěpitelné afinitní kotvy, následnou purifikaci vybraných proteinových fúzních partnerů a též studiu jeho struktury je věnována jedna z částí předkládané disertační práce.

3.5 *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Actinobacillus (dříve *Haemophilus*) *pleuropneumoniae* je specifickým prasečím patogenem náležejícím k čeledi *Pasteurellaceae* (Taylor, 1999). Jedná se o gramnegativní, aerobní tyčinky, popsané poprvé v roce 1964 (Shope, 1964a; Shope, 1964b). Jsou známy 2 biotypy zahrnující celkem 15 sérotypů (Blackall, 2002), přičemž všechny vyvolávají stejné onemocnění. Sérotypy biotypu 1 vyžadují pro svůj růst nikotinamid adenin dinukleotid (NAD, tzv. V faktor) (Taylor, 1999), sérotypy náležející k biotypu 2 jsou schopny syntézy NAD v přítomnosti specifických pyridinových nukleotidů, nebo jejich prekurzorů (Dom, 1994b). Jednotlivé sérotypy se dále rozlišují na bázi rozdílné exprese povrchových antigenních polysacharidových struktur (Perry, 1990). Všechny sérotypy jsou hemolytické a vykazují pozitivní CAMP-podobnou reakci (CAMP reakcí je nazývána lýze červených krvinek, jež je důsledkem společného působení specifického proteinu vnější membrány testované bakterie - CAMP faktor, kohemolysin - a sphingomyeliny C - beta-toxin - produkované bakterií *Staphylococcus aureus*) (Taylor, 1999), a navíc dávají všechny pozitivní ureasovou reakci (Taylor, 1999).

3.5.1 FAKTORY VIRULENCE A PATOGENICITA *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE*

Mezi hlavní a nejlépe prostudované faktory virulence bakterie *A. pleuropneumoniae* patří takzvané Apx proteiny (kap. 3.8), náležející do rodiny RTX proteinů (Frey, 1995; Frey, 1993a; Frey, 1993b; Frey, 1991a; Frey, 1991b; Frey, 1991c; Linhartova, 2010). Jejich exprese je sama o sobě určující pro virulenci bakterie, ale navíc různá kombinace produkovaných ApxI-III toxinů udává též míru virulence. Mezi nejvíce virulentní patří sérotypy 1, 5, 9 a 11, produkující kombinaci ApxI a ApxII. Tato skupina je též označována jako skupina A. K sérotypům skupiny B, tedy méně virulentním, náleží sérotypy 2, 3, 4, 6 a 8, které produkují ApxII a ApxIII. Skupinu C tvoří jediný sérotyp, a tím je sérotyp 10 (pouze ApxI). Sérotypy s nízkou virulencí jsou sérotypy 2 a 7 produkující naopak pouze ApxII (skupina D) (Bosse, 2002). V České republice a Střední Evropě patří mezi nejrozšířenější sérotypy *A. pleuropneumoniae* sérotyp 2 a 9 (KucEROVA, 2005).

Mezi další významné faktory virulence *A. pleuropneumoniae* patří též čtvrtý protein ze skupiny Apx, ApxIVA (Schaller, 1999) (kap. 3.8). Bylo ukázáno, že k jeho produkci dochází výhradně *in vivo* (Schaller, 1999; Cho, 2001). Biologická aktivita tohoto proteinu zůstává neznámá, nicméně nedávno byl popsán příspěvek rekombinantního ApxIVA antigenu k protektivnímu účinku podjednotkové vakcíny při čelení prasat (Wang, 2009).

Pro přežití v podmínkách s limitovanou dostupností železa disponuje *A. pleuropneumonie* několika různými systémy umožňujícími jeho získávání. Jedním z těchto systémů je komplex TbpA-TbpB (Transferrin Binding Protein) proteinů, který umožňuje praseti získávat železo vázané v plasmatickém glykoproteinu trasferinu (Gonzalez, 1990) (kap. 3.7). Bylo ukázáno, že prasata vakcinovaná rekombinantním TbpB jsou méně vnímavá k onemocnění vyvolanému experimentální čelenží *A. pleuropneumonie* sérotypu 7 (Rossi-Campos, 1992).

I přes výše uvedené podobnosti je však známo, že některé sérotypy vykazují větší virulenci než jiné (Frey, 1995; Rogers, 1990; Rosendal, 1985). Tato variabilita může být do jisté míry zapříčiněna produkcí rozdílných kombinací tzv. Apx toxinů, náležejících do rodiny RTX proteinů (Tab. 1). Mezi nejvíce virulentní sérotypy jsou pak řazeny ty, jež produkují kombinaci ApxI a ApxII toxinů (sérotypy 1a, 1b, 5a, 5b, 9, 11) (Boekema, 2004a; Frey, 1995). Mezi další faktory přispívající k významným rozdílům ve virulenci jednotlivých sérotypů *A. pleuropneumoniae*, jakož i k rozdílům mezi jednotlivými kmeny v rámci jednoho sérotypu patří zejména kapsule, různé typy adhezivních molekul, transferin-vázající proteiny, proteiny vnější membrány a sekretované proteasy. Spektrum těchto molekul je pro míru virulence rozhodující (Jacques, 1988; Jensen, 1986; Rosendal, 1983).

Onemocnění vyvolané *A. pleuropneumoniae* postihuje prasata všech věkových skupin, převážně však mladá prasata po odstavení (selata jsou chráněna mateřskými protilátkami). Není známa žádná anamnesticky významná bakteriální či virová infekce zapříčiňující predispozici ke vzniku aktinobacilové pleuropneumonie, nicméně byla prokázána zvýšená incidence tohoto onemocnění v souvislosti se stresem (Rosendal, 1983). Pleuropneumonie se přenáší kapénkově a může mít tři rozličné průběhy: akutní, perakutní a chronický (Rosendal, 1985; Rogers, 1990; Sebunya, 1983; Cruijssen, 1995b; Jobert, 2000). Akutní infekce se vyznačuje vysokými teplotami, ztrátou chuti k jídlu, kašlem, kýcháním, dušností až vážnými poruchami dechových funkcí provázených cyanosou, poruchami koordinace, průjmem a zvracením (Taylor, 1999; Rosendal, 1985; Liggett, 1987; Ajito, 1996). Výskyt pulmonárních lézí spojených s perakutním až akutním průběhem onemocnění je doprovázený přítomností rozsáhlého plicního edému, těžkým zánětem, krvácením do vlastní plicní tkáně a nekrosou (Rosendal, 1985; Ajito, 1996; Bertram, 1985). Krvavá pěna vytékající z čenichu a tlamy jako důsledek rozsáhlého plicního edému se objevuje v terminálním stádiu nemoci (Taylor, 1999; Rosendal, 1985).

Morbidita je vysoká, mortalita taktéž, a to především u prvoinfekcí, pokud je opomíjena odpovídající antibakteriální léčba. Hrudní dutina je často zaplněna serosangvinosní

tekutinou prosakující z plicní tkáně v důsledku jejího poškození (viz dále), patologické léze jsou lokalizovány v oblasti dýchacích orgánů. Postižen je nejvíce plicní epitel (srůsty, abscedace) a to zejména v diafragmatické části plic. Navíc se může postupně rozvinout fibrinózní, později fibrózní pleuritida a perikarditida (Rosendal, 1985).

V časných stádiích nemoci je patrná infiltrace polymorfonukleárními neutrofily, později je žřetelná infiltrace makrofágy a nekrotické oblasti jsou obklopeny odumírajícími leukocyty (Liggett, 1987; Ajito, 1996; Bertram, 1985). V alveolech nacházíme odumírající epiteliální buňky, dále makrofágy a polymorfonukleární neutrofily (Ajito, 1996; Perfumo, 1983). Těžká nekrotizující vaskulitida vede k porušení krevního řečiště v plicích, jejímž následkem je krvácení do dutiny hrudní (Rosendal, 1985; Liggett, 1987; Serebrin, 1991). V patologicky rozšířených plicních kapilárách jsou patrné četné odumírající erytrocyty, fibrin a trombocyty, podílející se na vzniku četných krevních sraženin (Perfumo, 1983). *A. pleuropneumoniae* je přítomen v alveolární a interlobulární tekutině. Z vlastního plicního parenchymu se může cestou lymfatických cév interlobulárního septa šířit do pleurální dutiny, ale i přes tuto skutečnost jsou bakterémie velmi zřídka (Ajito, 1996). Metodou *in situ* hybridizace byly prokázány vysoké počty *A. pleuropneumoniae* fagocytovaných alveolárními makrofágy, a současně bylo potvrzeno, že bakterie nenapadá buňky plicního epitelu (Min, 1998).

Zvířata, která přežijí infekci se mohou zcela zotavit, nicméně častěji přecházejí ze stavu akutní infekce do infekce chronické, vyznačující se přítomností diseminovaných nekrotických ložisek a/nebo výskytem opouzdřených abscesů pokrývajících oblasti fibrinózní pojivové tkáně (Rosendal, 1985), (Liggett, 1987). U takto chronicky nemocných prasat je pak možné izolovat *A. pleuropneumoniae* i z tonsilárních krypt, byť oblast tonsil nejeví žádné známky patologie (Sidibe, 1993).

Za posledních dvacet let se prasečí pleuropneumonie mohutně rozšířila. Stoupající význam tohoto onemocnění a potřeba jeho eradikace je dána zejména obrovskými hospodářskými ztrátami v rámci průmyslového chovu prasat.

3.5.2 PATOGENEZE AKTINOBACILOVÉ PLEUROPNEUMONIE A IMUNITNÍ ODPOVĚĎ HOSTITELE

V patogenesi prasečí aktinobacilosy rozlišujeme tři hlavní kroky: kolonizaci, únik před ochrannými imunitními funkcemi hostitele a poškození hostitelských tkání. Na rozdíl od celkového podrobného obrazu infekce, faktory virulence přispívající k rozvoji jednotlivých klinických symptomů jsou známy a popsány v následujících odstavcích.

3.5.2.1 Kolonizace hostitele

Schopnost patogena přilnout k buňkám tkání hostitele a pomnožit se v něm je často nezbytným předpokladem pro vznik infekce. Fimbrie (též označované jako pili) jsou mezi bakteriemi rozšířeným prostředkem umožňujícím kolonizaci mukózních membrán hostitelského organismu (Nassif, 1997; Strom, 1993). Fimbrie jsou přítomny na povrchu širokého spektra patogenních bakterií a jejich role v patogenesi byla důkladně popsána (Sauer, 2000). Mohou zprostředkovat kolonizaci specifickou vazbou na různé typy molekul přítomných na povrchu eukaryotních buněk, v extracelulární matrix, či mohou být prostředkem spojení jednotlivých bakteriálních buněk při tvorbě mikrokolonií. Taktéž mohou usnadňovat vstup patogena do hostitelských buněk (Abraham, 1998; Donnenberg, 2000; Kubiet, 2000). Fimbrie jsou molekuly vyznačující se vysokou antigenicitou a byly s úspěchem použity k přípravě vakcín cílených proti širokému spektru bakteriálních patogenů {Lepper, 1995, 7571364; Stewart, 1987, 2883966}.

3.5.2.2 *ApfA*

In vivo experimenty odhalily, že *A. pleuropneumoniae* se po intranasálním podání velmi silně váže k řasinkovému epitelu dolní části dýchacího traktu - buňkám terminálních bronchiolů a epiteliálním buňkám alveolů. Naproti tomu nebyla prokázána adherence k řasinkovému epitelu průdušnice a průdušek (Dom, 1994a; Jacques, 1991). Předpokládá se, že jedním z hlavních kolonizačních faktorů *A. pleuropneumoniae* jsou fimbrie (pili).

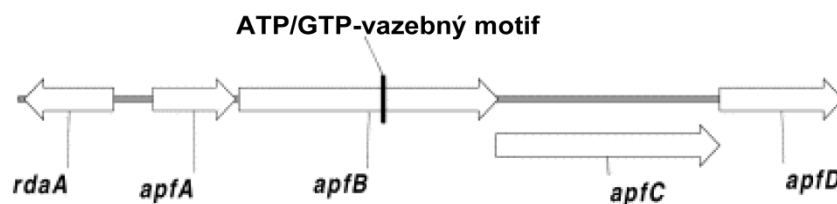
Přítomnost fimbrií na povrchu *A. pleuropneumoniae* byla popsána poprvé v roce 1991 (Dom, 1994a; Utrera, 1991), avšak jejich exprese se při několikanásobných pasážích od izolace z hostitelského organismu velmi rychle vytrácí (Utrera, 1991). Intaktní fimbrie a fimbriální podjednotky *A. pleuropneumoniae* byly následně izolovány ze sérotypů 1, 2, 7 a 12 (Zhang, 2000). Produkce fimbrií u ostatních sérotypů nebyla doposud prozkoumána. Metodou N-koncového sekvenování fimbriálních podjednotek bylo ukázáno, že prvních 12 aminokyselinových zbytků je identických prvním dvanácti aminokyselinovým zbytkům fimbrií pocházejících z jiných bakteriálních druhů (HdfA *Haemophilus ducreyi*, AaPilA *A. ctinomyces* *comitans*, PtfA *P. multocida*, PpdD *H. influenzae*, PilA *P. aeruginosa*, Pile *N. meningitidis*, FimA *Dichelobacter nodosus*, TfpI *Mycobacterium bovis* a LpPile *Legionella pneumophila*) (Stevenson, 2003). Navíc bylo ukázáno, že intaktní fimbrie, stejně tak jako jednotlivé fimbriální podjednotky izolované z *A. pleuropneumoniae* poskytují křížovou reakci s fimbriální podjednotkou fimbrií typu IV bakterie *Moraxella bovis* (Zhang, 2000). Fimbrie typu IV jsou přítomny na povrchu velkého počtu gramnegativních bakterií, na základě

strukturních odlišností se dále dělí na fimbrie skupiny A, produkované *Pseudomonas aeruginosa* (Alm, 1997), *Pasteurella multocida* (Doughty, 2000), *Moraxella bovis* (Beard, 1990), *Haemophilus influenzae* (Fleischmann, 1995), *Legionella pneumophila* (Stone, 1998) a *Dichelobacter nodosus* (Elleman, 1984). Do další skupiny náleží fimbrie velkého počtu tzv. HAP organismů (Kachlany, 2001).

Zkratkou HAP (*Haemophilus-Actinobacillus-Pasteurella*) se označuje významná skupina patogenů zvířat a člověka. Přestože každý ze zahrnutých bakteriálních druhů vykazuje více či méně rozdílné vlastnosti i specifitu ve vztahu k hostitelskému organismu, všechny spojuje rozvinutá schopnost odolávat buněčným obranným mechanismům hostitele. V některých případech (např. u *P. multocida*, *P. haemolytica* a *A. pleuropneumoniae*) je rezistence zčásti daná přítomností kapsule, která znemožňuje, aby byly bakterie fagocytovány neutrofily a makrofágy. V jiných případech bakterie atakují mononukleární a polymorfonukleární fagocyty jako takové. Například, *P. haemolytica*, *A. pleuropneumoniae* a *Actinobacillus actinomycetemcomitans* produkují leukotoxin, který paralyzuje funkce fagocytů a v konečné fázi zabíjí leukocyty hovězí, prasečí i lidské. U *P. multocida* a *Haemophilus somnus* byly však popsány i takové složky, jež mají na funkce leukocytů zcela opačný efekt. Některé HAP organismy, mají též schopnost stimulovat či modulovat únik prozánětlivých mediátorů, jakým je například interleukin-1 (Czuprynski, 1990).

Produkce fimbrií u *A. pleuropneumoniae* je nestabilní (Utrera, 1991; Zhang, 2000). Z pozorování je zatím patrné, že k indukci exprese dochází, tak jako u mnoha jiných bakteriálních druhů, na základě kontaktu s epitelii hostitele *in vivo* (Zhang, 2000), přičemž je nutné poznamenat, že počty fimbrií přítomných na povrchu izolátů pocházejících z různých částí dýchacího traktu (plíce, nosní dutiny a tonsily) se významně neliší. Tato skutečnost poukazuje na fakt, že produkce fimbrií hraje důležitou roli v kolonizaci tkání hostitele (Utrera, 1991).

Fimbrie jsou u *A. pleuropneumoniae* kódovány genem nazvaným *apfA*, náležejícím do operonu *apfABCD* (Obr. 10).



Obr. 10: Uspořádání operonu (*apfABCD*) pro fimbrie typu IV *A. pleuropneumoniae* (GenBank AF302997). Gen *rdaA* je predikovaným homologem genu kódujícího protein pro opravu DNA u *H. influenzae*. Prekurzor prepilinové podjednotky typu IV (*apfA*), předpokládaný protein biogeneze pilinu typu IV (*apfB*), protein biogeneze pilinu typu IV (*apfC*). Gen *apfD* je putativní prepilin typ IV dependentní peptidasa.

3.5.2.3 Struktura a funkce transferin-vázajícího proteinu B (*TbpB*)

Získávání železa z hostitelského prostředí, tedy z prostředí s jeho omezenou dostupností, patří mezi esenciální schopnosti umožňující přežívání mnohých bakteriálních patogenů v hostiteli (Weinberg, 1978). Experimenty provedené na patogenních druzích *Neisseria* spp. ukázaly, že tyto bakterie získávají železo ze zásobních glykoproteinů transferinu a laktoferinu jejich přímou vazbou na receptor na svém povrchu (Griffiss, 1982; Mickelsen, 1982; Simonson, 1982). Vazebnými studiemi bylo též prokázáno, že tyto receptory jsou vůči glykoproteinům konkrétního hostitele vysoce specifické (Blanton, 1990; Cornelissen, 1992; Pettersson, 1994; Schryvers, 1988). Přítomnost receptorů pro transferin u mnohých dalších gramnegativních bakteriálních druhů, patogenů zvířat i člověka, poukazuje na fakt, že tento receptorem-zprostředkovaný způsob získávání železa je poměrně rozšířený {Gonzalez, 1990, 2233254; Ogunnariwo, 1990, 2365453; Schryvers, 1992, 1588135; Schryvers, 1989, 2543489}.

Transferinový receptor se obecně skládá ze dvou železem-regulovatelných proteinů vnější membrány, TbpA a TbpB (Ogunnariwo, 1991). TbpA je transmembránový protein příbuzný rodině TonB-dependentních receptorů, přístupný na buněčném povrchu a je nezbytný pro vazbu transferinu (Cornelissen, 1992; Gray-Owen, 1995; Irwin, 1993; Legrain, 1993). TbpB je taktéž povrchově přístupný, jedná se však o lipoprotein připoutaný k buněčné membráně právě skrze svůj lipidový konec (Irwin, 1993; Legrain, 1993).

U *A. pleuropneumoniae* byly proteiny tohoto receptorového systému původně pojmenovány TfbB (TbpA) a TfbA (TbpB). Oba tyto proteiny jsou vysoce specifické pro prasečí transferin (Gonzalez, 1990). Jejich geny byly klonovány a charakterizovány. Bylo zjištěno, že uspořádání *tbp* operonu je shodné jako u *N. meningitidis* a tedy, že k přepisu obou genů dochází ze společného promotoru (obecně platí, že je každý z genů přepisován

jednotlivě) (Anderson, 1994; Legrain, 1993). U TbpB proteinu byla však na rozdíl od jeho homologu produkovaného *Neisseria* spp. navíc prokázána schopnost vázat hemin (Gerlach, 1992). Podobnost mezi transferin-vázajícími proteiny *A. pleuropneumoniae* a *N. meningitidis* je natolik vysoká, že *N. meningitidis* nesoucí *tbp* geny *A. pleuropneumoniae* je schopna efektivně využít prasečí transferin (Litt, 2000).

Rekombinantní TbpB *A. pleuropneumoniae* je vysoce imunogenní, avšak účinnost vakcíny, ve které je využit jako jediná komponenta, je velmi nízká (Rossi-Campos, 1992).

3.5.2.4 Apx proteiny

Jak již bylo uvedeno v kapitole 3.5.1, jedná se o skupinu RTX proteinů, faktorů virulence *A. pleuropneumoniae*, z nichž první tři, ApxI-III, jsou vysoce toxické pro prasečí alveolární makrofágy a neutrofile (Tab. 1) (Frey, 1994).

ApxIA je silně hemolytický a silně cytolytický protein o relativní molekulové hmotnosti 105-110 kDa. Původně byl pojmenován hemolysin I či též cytolsin I, protože vykazuje vysoký stupeň homologie s α -hemolysinem *E. coli* a částečně je podobný také leukotoxinu *P. haemolytica*. Je produkován sérotypy 1, 5, 9, 10 a 11 a taktéž *A. suis* (Kamp, 1994).

V případě ApxIIA se jedná o slabě hemolytický a slabě cytotoxický exotoxin, původně pojmenovaný hemolysin II či též cytolsin II. Jeho relativní molekulová hmotnost je 103-105 kDa a je produkován všemi sérotypy, vyjma sérotypu 10. Je rovněž produkován *A. suis*. ApxIIA je blízce příbuzný leukotoxinu *P. haemolytica* (Kamp, 1994).

ApxIIIA není hemolytický, ale silně cytotoxický. Jeho původní pojmenování pleurotoxin bylo odvozeno právě od jeho vysoké toxicity. Je produkován všemi sérotypy biotypu 1, tedy 2, 3, 4, 6, 8 a jeho relativní molekulová hmotnost je 120 kDa (Kamp, 1994).

Strukturní geny, stejně tak jako geny pro aktivaci a sekreci ApxI-III toxinů byly charakterizovány a odpovídají svým uspořádáním i funkcí prototypu tzv. RTX operonu (viz kap. 3.2.1) (Tab. 1) (Foote, 2008).

Poslední z Apx proteinů, pojmenovaný ApxIVA byl identifikován teprve v roce 1999 (Schaller, 1999). ApxIVA je protein specifický pro *A. pleuropneumoniae*, geneticky značně odlišný od Apx toxinů (Schaller, 1999). Je exprimován všemi sérotypy, avšak pouze *in vivo*, v průběhu akutního onemocnění. Bylo též ukázáno, že *A. pleuropneumoniae* nesoucí delecí genu pro ApxIVA je zcela avirulentní, nicméně jeho toxické účinky se doposud nepodařilo prokázat, a jeho biologická funkce je neznámá (Tab. 1) (Liu, 2009).

Uspořádání *apxIV* operonu, a též přítomnost sekvence kódující tzv. samoštěpitelný modul jsou atributy zcela totožné s těmi, které byly výše popsány pro protein FrpC *N. meningitidis* (kap. 3.4 a 3.5). Pokud je ApxIVA exprimován rekombinantně v *E. coli*, vykazuje slabou hemolytickou aktivitu a jeho relativní molekulová hmotnost je 200 kDa (Tab. 1) (Frey, 2002; Schaller, 1999).

Tab. 1: **Apx toxiny produkované jednotlivými sérotypy *A. pleuropneumoniae*** (Frey et al., 1995; Schaller et al., 1999). Strukturní proteiny ApxI-IVA jsou pro názornost uvedeny jako ApxI-IV.

Operon				Aktivita		Mol.hmotnost (kDa)	Serotyp
	Aktivátor	Strukturní	Export	Hemolytická	Cytotoxická		
ApxI	<i>apxIC</i>	<i>apxIA</i>	<i>apxIBD^a</i>	silná	silná	105–110	1, 5a, 5b, 9, 10, 11
ApxII	<i>apxIIC</i>	<i>apxIIA</i>	<i>není^a</i>	slabá	středně silná	103–105	všechny kromě 10
ApxIII	<i>apxIIIC</i>	<i>apxIIIA</i>	<i>apxIIIBD</i>	není	silná	120	2, 3, 4, 6, 8
ApxIV ^b	ORF1? ^c	<i>apxIVA</i>	<i>není^a</i>	slabá	ND ^d	200 ^e	všechny

^a*apxIBD* geny se vyskytují ve všech sérotypech kromě sérotypu 3. Sekrece ApxIIA je zprostředkována pomocí ApxIBD. Až doposud nejsou známy žádné údaje o sekreci ApxIVA.

^bNa rozdíl od ostatních Apx toxinů, ApxIVA je produkován výhradně *in vivo*.

^cOrf1 se zdá být nezbytným pro aktivitu ApxIVA, ačkoli nevykazuje žádné známky homologie s ApxIC, ApxIIC, nebo ApxIIIC.

^dND: není definována.

^eMolekulová hmotnost ApxIVA je odvozena z proteinové sekvence.

3.5.3 VAKCINACE PROTI AKTINOBACILOVÉ PLEUROPNEUMONII

Je známo, že prodělaná přirozená akutní infekce způsobená *A. pleuropneumoniae* poskytuje doživotní ochranu proti sérotypu, jež infekci vyvolal, ne však již proti sérotypům zbývajícím. Byla však prokázána ochrana před infekcí vyvolanou sérotypem *A. pleuropneumoniae* produkujícím alespoň jeden shodný Apx toxin jako sérotyp, proti kterému byla zjištěna přítomnost sérových protilátek (Cruijssen, 1992).

Jak experimentálně provedená, tak i výše zmíněná přirozená infekce *A. pleuropneumoniae* stimulují imunitní odpověď hostitelského organismu. Hladina cirkulujících protilátek může být stanovena například komplement-fixačním testem, a to již 10 dní po

provedené experimentální infekci. Nejvyšších hladin protilátek je dosaženo ve třetím až čtvrtém týdnu po infekci. Tyto vysoké hladiny protilátek přetrvávají v séru rekonvalescentních prasat po mnoho měsíců. Podání imunních sér zajišťuje ochranu před infekcí vyvolanou *A. pleuropneumoniae*, což poukazuje na skutečnost, že systémová imunitní odpověď proti *A. pleuropneumoniae* může hrát roli v ochraně před pleuropneumonií a buněčná imunita není v tomto případě esenciální (Bosse, 2002; Jansen, 1994). Tato imunitní odpověď je zprostředkována tak jako u mnoha jiných infekcí především imunoglobuliny G, jež mohou snadno prostupovat přes placentu, čímž je zajištěna též pasivní ochrana mláďat. Protektivní hladina kolostrálních protilátek v jejich krvi přetrvává prokazatelně ještě tři týdny po porodu (Bosse, 2002; Byrd, 1992a; Byrd, 1992b; Devenish, 1990; Jansen, 1994; Nicolet, 1992).

Alveolární makrofágy a neutrofily jsou důležitou součástí obrany plic proti bakteriálním infekcím. Fagocytóza *A. pleuropneumoniae* je však umožněna pouze v přítomnosti protilátek zacílených proti jeho povrchovým a na povrch produkovaným antigenům, zejména Apx toxinům (Frey, 1994; Rosendal, 1985). Nicméně ani přítomnost těchto protilátek nedokáže zamezit smrti alveolárních makrofágů po ingesci *A. pleuropneumoniae*. Na druhé straně jsou to právě protilátky proti Apx toxinům, jež zajišťují ochranu neutrofilů a umožňují jim za pomoci opsoninů (LPS, kapsule, proteiny vnější membrány) účinně odstranit zbytky alveolárních makrofágů s fagocytovanými bakteriemi (Cruijssen, 1992; Jansen, 1994). Účast komplementu nebyla na této úrovni prokázána (Rycroft, 1990; Ward, 1994).

Za posledních patnáct let byla vyvinuta řada vakcín proti prasečí pleuropneumonii. Hlavní složky těchto vakcín představují zejména Apx toxiny, Tbp proteiny, proteiny vnější membrány či membránové, případně celobuněčné frakce *A. pleuropneumoniae*. Ať už se jedná o přípravky celobuněčné, či rekombinantní, doposud nebyl překonán největší problém v cestě za vakcínou, jež by účinně chránila zejména prasata těsně po odstavení proti všem sérotypům *A. pleuropneumoniae* (Bei, 2007; Lei, 2008; Lin, 2007; Liu, 2007; Maas, 2006; Oldfield, 2008; Ramjeet, 2008; Xu, 2006).

Problematice vakcinace prasat proti aktinobacilové pleuropneumonii a vývoji účinné rekombinantní vakcíny je věnována druhá část této disertační práce.

4 CÍLE

4.1 Studium mechanismu autokatalytického štěpení RTX proteinu FrpC bakterie *Neisseria meningitidis*

- **Příprava fúzních rekombinantních proteinů pro charakterizaci autokatalytických vlastností samoštěpitelného modulu (SPM) proteinu FrpC.**
 - amplifikace genů pro chloramfenikol acetyltransferasu (Cat), β -galaktosidasu (LacZ), glutathion-S-transferasu (GST), maltosu-vázající protein E (MalE) a úseku genu *cyaA* kódujícího adenylátcyklasovou doménu (AC)
 - konstrukce expresních vektorů pro produkci fúzních proteinů Cat-SPM-CBD, LacZ-SPM-CBD, GST-SPM-C-His, MalE-SPM-C-His a AC-SPM-CBD
 - produkce, purifikace a studium kinetiky štěpení uvedených fúzních proteinů
- **Příprava mutantních variant SPM rekombinantního proteinu FrpC.**
 - predikce a mapování neesenciálních oblastí proteinu SPM přístupných štěpení působením proteolytických enzymů *in silico* a *in vitro* metodou parciálních štěpů po opůsobení vybranými proteolytickými enzymy
 - určení minimální části SPM proteinu FrpC zodpovědné za jeho autokatalytickou štěpící aktivitu metodou deleční mutagenese (příprava sady delečních variant fúzního proteinu GST-SPM-C-His nesoucích jednotlivé zkrácené varianty SPM navržené dle výsledků predikcí a proteolýzy)
 - produkce, purifikace a ověření štěpitelnosti jednotlivých zkrácených variant GST-SPM-C-His

- **Studium struktury a kinetiky štěpení zkrácené formy SPM₁₇₇ proteinu FrpC.**
 - studium struktury zkrácené formy SPM₁₇₇ proteinu FrpC pomocí ¹H a ¹³C NMR
 - studium významu konzervovaného aspartátového zbytku v pozici 165 SPM (Asp₁₆₅) ve vztahu k autokatalytické štěpící aktivitě SPM
 - studium vlivu aminokyselinového složení N-terminálního konzervovaného oktapeptidu SPM na jeho autokatalytickou štěpící aktivitu
- **Studium samoštěpitelného modulu (SPM_{IV}) rekombinantního proteinu ApxIVA bakterie *A. pleuropneumoniae*.**
 - příprava mutantních variant SPM_{IV} rekombinantního proteinu ApxIVA metodou deleční mutagenese (příprava sady delečních variant fúzního proteinu GST-SPM_{IV}-C-His nesoucích jednotlivé zkrácené varianty SPM_{IV} navržené dle výsledků získaných predikcí a studiem delečních variant proteinu GST-SPM-C-His)
 - produkce, purifikace a ověření štěpitelnosti jednotlivých zkrácených variant GST-SPM_{IV}-C-His
 - určení minimální aktivní části SPM_{IV} nezbytné k účinnému štěpení fúzního proteinu GST-SPM_{IV}-C-His
- **Studium vlivu záměny SPM za SPM_{IV} v původním rekombinantním FrpC proteinu.**
 - příprava expresního vektoru pro produkci rekombinantního FrpC proteinu nesoucího sekvenci kódující SPM_{IV} výměnou za sekvenci kódující SPM původního FrpC proteinu
 - produkce, purifikace a ověření štěpitelnosti takto připraveného proteinu

4.2 Příprava rekombinantních antigenů bakterie *Actinobacillus pleuropneumoniae* a jejich využití v experimentální vakcíně proti prasečí pleuropneumonii

- **Příprava a použití vybraných rekombinantních antigenů *A. pleuropneumoniae*.**
 - amplifikace a klonování genů kódujících proteiny ApfA, ApxI-IVA a TbpB z *A. pleuropneumoniae*
 - konstrukce expresních vektorů pro produkci jednotlivých rekombinantních proteinů (rApfA, rApxIA, rApxIIA, rApxIIIA, rApxIVA, rTbpB)
 - produkce a purifikace rekombinantních antigenů
- **Příprava myších hyperimunních sér, zavedení a optimalizace ELISA metody pro specifickou detekci hladin sérových protilátek proti jednotlivým rekombinantním antigenům rApxIA, rApxIIA a rApxIIIA.**
- **Studium imunoprotektivních účinků připravených rekombinantních antigenů v imunoprophylaxi prasat proti aktinobacilové pleuropneumonii.**
 - zavedení a optimalizace vhodného imunizačního schématu pro imunizace prasat jednotlivými rekombinantními antigeny, případně jejich kombinacemi a následná detekce hladin sérových protilátek proti jednotlivým rekombinantním antigenům v různých předem specifikovaných bodech imunizačního schématu
 - experimentální intranasální infekce (čelenž) prasat po imunizaci 50% letální dávkou *A. pleuropneumoniae* sérotyp 9 s následným sledováním klinických projevů pleuropneumonie u jednotlivých vakcinovaných skupin
 - vyhodnocení výsledků opakované experimentální infekce a stanovení účinnosti jednotlivých vakcín

5 MATERIÁLY A METODY

5.1 Seznam použitých chemikálií

β -merkaptoethanol, Merck, SRN

λ -DNA, MBI Fermentas, Litva

Adenosin-5'-trifosfát (ATP) , Sigma-Aldrich, USA

Agarosa pro DNA elektroforesu, Promega, USA

Akrylamid, Sigma-Aldrich, USA

Ampicilin, Biotika, Slovenská Republika

Azid sodný, Sigma-Aldrich, USA

Bacto-tryptone, Oxoid, Anglie

Bakteriologický agar, Oxoid, Anglie

Bromfenolová modř, Sigma-Aldrich, USA

Bacto Proteose Peptone No.3, BD, Česká republika

β -NAD, Sigma-Aldrich, USA

Complete Mini (EDTA-free Protease Inhibitor Coctail Tablets), Roche, SRN

Coomassie Blue G-250, Serva, SRN

Coomassie Blue R-250, Serva, SRN

DEAE-Sepharosa CL-6B, Pharmacia, Česká republika

Dihydrogenfosforečnan draselný, Lachema, Česká republika

Dihydrogenfosforečnan sodný (dihydrát), Lachema, Česká republika

Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich, USA

Dithiothreitol (DTT), Serva, SRN

dNTP mix (10 mM roztok), MBI Fermentas, Litva

Dodecylsulfát sodný (SDS), Serva, SRN

Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného, Lachema, Česká republika

Ethanol, Lachema, Česká republika

Ethidiumbromid, Serva, SRN

Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), Serva, SRN

Fenol, Sigma-Aldrich, USA

G.C.agar base, Bio-rad, Česká republika

Glukosa, Lachema, Česká republika

L-Glutamin, Sigma-Aldrich, Česká republika

Glycerol, Lachema, Česká republika
Hovězí sérový albumin (BSA), frakce V, Sigma-Aldrich, USA
Hydrogenfosforečnan draselný, Lachema, Česká republika
Hydrogenfosforečnan sodný (heptahydrát), Lachema, Česká republika
Hydrogenuhličitan sodný, 7,5 % (w/v), Přípravná medií, Praha-Dejvice, Česká republika
Hydroxid draselný, Lachema, Česká republika
Hydroxid sodný, Lachema, Česká republika
Chlorid draselný, Lachema, Česká republika
Chlorid hořečnatý, Lachema, Česká republika
Chlorid sodný, Lachema, Česká republika
Chlorid vápenatý, Lachema, Česká republika
Chloroform, Penta, Česká republika
Imidazol, Fluka, SRN
Isopropanol, Penta, Česká republika
Isopropyl β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG), Sigma-Aldrich, USA
IsoVitalX, BD, Česká republika
Kanamycin, Sigma-Aldrich, USA
Krevní agar č. 4, Columbia Blood Agar Base, HIMEDIA, Mumbai, Indie
Kvasničný extrakt, Oxoid, Anglie
Kyselina boritá, Lachema, Česká republika
Kyselina chlorovodíková, Lachema, Česká republika
Kyselina fosforečná, Lachema, Česká republika
Kyselina octová, Lachema, Česká republika
Methanol, Lachema, Česká republika
Mléko odtučněné sušené, Milli, Česká republika
Močovina, Lachema, Česká republika
N,N'-methylenbis-akrylamid, Serva, SRN
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), Serva, SRN
Ni-NTA agarosa, Qiagen, SRN
Nitrocelulosová membrána BioTrace NT, Pall, USA
Nonahydrát dusičnanu železitého,
Octan draselný, Lachema, Česká republika
Octan sodný, Lachema, Česká republika

O-nitrophenyl- β -D-galaktosid, Sigma-Aldrich, USA

Paraformaldehyd, Sigma-Aldrich, USA

Peroxid vodíku, Lachema, Česká republika

Persulfát amonný (APS), Serva, SRN

Pyrofosforečnan sodný, Lachema, Česká republika

Rychloustalovač pro ruční zpracování RTG filmů, Foma, Česká republika

Sestava na izolaci DNA, Top-Bio, Česká republika

Sestava QCL-100 na stanovení LPS, Cambrex, USA

Síran hořečnatý, Sigma-Aldrich, USA

Síran sodný, Fluka, SRN

Standardy (High Range Molecular Weight Standards) pro určování hmotnosti proteinů pro SDS-PAGE o složení: myosin (205 kDa), β -galaktosidasa (116,5 kDa), fosforylasa (97,4 kDa), BSA (66,2 kDa), ovalbumin (45 kDa), anhydrasa (31 kDa), trypsin inhibitor (21 kDa) a lysozym (14 kDa); Bio-Rad, USA

Tetracyklin hydrochlorid, Sigma-Aldrich, USA

Thiamin hydrochlorid, Calbiochem, USA

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), Serva, SRN

Tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl), Serva, SRN

Tween 20, Sigma-Aldrich, USA

Uhličitan sodný, Lachema, Česká republika

Vývojka pro ruční zpracování RTG filmů, Foma, Česká republika

Všechny použité chemikálie dosahovaly analytické čistoty.

5.2 Přístrojové vybavení

CO₂ inkubátor IG 150, Jouan, Francie

Digitální analytické váhy, Mettler, SRN

Elektroforéza Mini-PROTEAN II, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA

Invertovaný mikroskop IX 71, Olympus, Japonsko

Laboratorní třepačka LT-2, Kavalier, Votice

Laminární box MSC 12, Jouan, Francie

Mrazicí box (-150 °C), Sanyo, USA

Mrazicí box (-20 °C), Zanussi, Jugoslávie

Mrazicí box (-80 °C), Jouan, Francie

Odstředivka Biofuge pico, Heraeus Instruments, SRN
 Odstředivka Sorvall OTD Combi, Du Pont Instruments, USA
 Odstředivka Sorvall RC5C Plus, Du Pont Instruments, USA
 Odstředivka Sorvall RC26 Plus, Du Pont Instruments, USA
 Odstředivka Sorvall RT6000B, Du Pont Instruments, USA
 Odstředivka Universal 32R, Hettich Zentrifugen, SRN
 pH-metr MV 870, Prácticronick, SRN
 Předvážky Nagma, OWA Labor, SRN
 Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky Twinreader Plus, Tecan, USA
 Suchý termostatovaný blok, Vývojové dílny ČSAV, Česká republika
 Termostatovaná vodní lázeň typ 357, Elpan, Polsko
 Termostatovaná vodní lázeň typ U7C, VEC MLW, SRN
 Termostatovaná vodní lázeň typ UH8, VEB MLW, SRN
 Ultrasonikátor S300, Misonix, USA
 Vortex MS 1, IKA-Works, Inc., USA
 Zařízení pro DNA elektroforesu, Bio Rad, Inc., USA
 Zařízení pro izolaci DNA (Lego-kit), TopBio, Česká republika
 Zařízení pro Western blot Semiphor, Hoefer, USA
 Zdroj pro elektroforézu, Bio Rad, Inc., USA
 Zdroj UV záření, Ultra Violet Products, Inc., USA

5.3 Použité restrikční endonukleasy

Tab. 2: Seznam použitých restrikčních endonukleas

Enzym	Zásahové místo	Výrobce	Vhodný reakční NEB pufr	Reakční teplota (°C)	Vyžaduje 0,01% BSA
<i>BamH</i> I	G/GATCC	NEB, USA	NEBuffer BamH I	37	ano
<i>BsrG</i> I	T/GTACA	NEB, USA	2, 4	37	ano
<i>BstB</i> I	TT/CGAA	NEB, USA	4	65	ne
<i>EcoR</i> I	G/AATTC	NEB, USA	1, 2, 3, 4	37	ne
<i>EcoR</i> V	GAT/ATC	NEB, USA	3	37	ano
<i>Hind</i> III	A/AGCTT	NEB, USA	2	37	ne
<i>Kpn</i> I	GGTAC/C	NEB, USA	1	37	ano

<i>Nco</i> I	C/CATGG	NEB, USA	1, 2, 3, 4	37	ne
<i>Nde</i> I	CA/TATG	NEB, USA	2,4	37	ne
<i>Nhe</i> I	G/CTAGC	NEB, USA	2	37	ano
<i>Not</i> I	GC/GGCCG C	NEB, USA	3	37	ano
<i>Sal</i> I	G/TCGAC	NEB, USA	3	37	ano
<i>Spe</i> I	A/CTAGT	NEB, USA	2	37	ano
<i>Xba</i> I	T/CTAGA	NEB, USA	2	37	ano
<i>Xho</i> I	C/TCGAG	NEB, USA	2, 3, 4	37	ano

Y..... pyrimidinová báze

R..... purinová báze

5.4 Ostatní enzymy

- Alkalická fosfatasa (SAP), MBI Fermentas, Litva
- Pankreatická ribonukleasa (RNasa), MBI Fermentas, Litva
- T4 DNA-ligasa, MBI Fermentas, Litva - dodávaný s T4 DNA ligačním pufrem (10x koncentrovaný, pH 7,5, 660 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP)
- T4 DNA polymerasa, New England Biolabs, USA
- Phusion T4 DNA polymerasa (Top-Bio, Česká republika) s kompletním pufrem (10x koncentrovaný, pH 8,8, 100 mM KCl, 200 mM Tris-HCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1% Triton X-100)
- RNasa A, Qiagen, SRN

5.5 Seznam použitých protilátek

- anti-6xHis monoklonální protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou, Sigma-Aldrich, USA
- anti-rFrpC₁₈₂₉ králičí polyklonální protilátka, Exbio, a. s., Česká republika
- anti-rFrpC₁₋₄₁₄ králičí polyklonální protilátka, Exbio, a. s., Česká republika
- anti-rFrpD králičí polyklonální protilátka, Exbio, a. s., Česká republika
- myší polyklonální hyperimunní séra (anti-rApfA, anti-rApXI-IVA, anti-TbpB), Bioveta, Česká republika
- prasečí polyklonální postvakcinační séra (anti-rApfA, anti-rApXI-IVA, anti-TbpB), Bioveta, Česká republika

- anti-myší Ig protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou, Amersham, USA
- anti-králičí Ig protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou, Amersham, USA
- anti-prasečí Ig protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou, Amersham, USA

5.6 Použité roztoky a pufry

Složení jednotlivých NEB pufrů (New England Biolabs, USA), použitých při štěpení restrikčními endonukleasami:

NEB pufr 1 (10x koncentrovaný): pH 7,0

Bis Tris Propan-HCl.	100 mmol/l
MgCl ₂	100 mmol/l
DTT	10 mmol/l

NEB pufr 2 (10x koncentrovaný): pH 7,9

Tris-HCl	100 mmol/l
MgCl ₂	100 mmol/l
NaCl	500 mmol/l
DTT	10 mmol/l

NEB pufr 3 (10x koncentrovaný): pH 7,9

Tris-HCl	500 mmol/l
MgCl ₂	100 mmol/l
NaCl	1000 mmol/l
DTT	10 mmol/l

NEB pufr 4 (10x koncentrovaný): pH 7,9

Tris-acetát	200 mmol/l
Acetát hořečnatý	100 mmol/l
Acetát draselný	500 mmol/l
DTT	10 mmol/l

NEB pufr pro T4 DNA ligasu (10x koncentrovaný):

Tris-HCl (pH 7,5)	660 mmol/l
MgCl ₂	50 mmol/l
Dithiotreitol	100 mmol/l
ATP	10 mmol/l

NEB Phusion HF complete buffer pro T4 DNA polymerasu (5x koncentrovaný):

- složení viz výrobce

Dále je uvedeno složení ostatních používaných pufrů a roztoků:

30% roztok akrylamidu pro SDS-PAGE:

Akrylamid	29% (w/v)
N,N'-metylenbisakrylamid	1% (w/v)

Barvicí roztok pro SDS-PAGE:

Methanol	225 ml
Voda	225 ml
Kyselina octová	50 ml
Coomassie Blue G250	0,5 g

BFB (5x koncentrovaný):

Bromfenolová modř	0,25 (w/v)
Glycerol	40 % (v/v)

Blotovací pufr:

pH 8,3

Glycin	39 mmol/l
Tris	48 mmol/l
SDS	0,0375 % (w/v)
Methanol	20% (w/v)

Činidlo Bradfordové:

Coomassie Blue R250	0,01 % (w/v)
Ethanol	4,7 % (v/v)
H ₃ PO ₄	8,7 % (v/v)

Chemiluminiscenční roztok A:

pH 8,8

Roztok 1:

Luminol (rozpustit v DMSO)	2,5 mmol/l
Tris-HCl	100 mmol/l

Roztok 2:

Kyselina p-kumarová (rozpustit v DMSO).....90 mmol/l

Výsledný roztok A: k 10 ml roztoku 1 přidat 44 µl roztoku 2.

Chemiluminiscenční roztok B:

pH 8,5

H ₂ O ₂	5,4 mmol/l
Tris-HCl	100 mmol/l

Před detekcí byly smíchány chemiluminiscenční roztok A a roztok B v poměru 1:1.

Roztoky byly před detekcí uchovávány zamrazené při teplotě -80 °C.

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE:

Methanol	250 ml
Voda	650 ml
Kyselina octová	100 ml

PBS:

pH 7,4

NaCl	138 mmol/l
KCl	3 mmol/l
Na ₂ HPO ₄	12 mmol/l
KH ₂ PO ₄	2 mmol/l

PBST:

Tween 20	0,1 % (w/v)
v PBS	

PBST/mléko:

Sušené mléko	5 % (w/v)
Tween 20	0,1 % (w/v)
v PBS	

PBS/BSA:

BSA	2 % (w/v)
v PBS	

Rozdělovací gel pro SDS-PAGE 7,5 %:

pH 8,8

30 % roztok akrylamidu	1,24 ml
Destilovaná voda	1,8 ml
1 M Tris-HCl pufr	1,87 ml
10 % SDS	50 µl
20 % APS	12,5 µl
TEMED	12,5 µl

Rozdělovací gel pro SDS-PAGE 10 %:

pH 8,8

30 % roztok akrylamidu	1,66 ml
Destilovaná voda	2,07 ml
1 M Tris-HCl pufr	1,87 ml
10 % SDS	50 µl
20 % APS	12,5 µl
TEMED	12,5 µl

Rozdělovací gel pro SDS-PAGE 12,5 %:

pH 8,8

30 % roztok akrylamidu	2,07 ml
Destilovaná voda	0,98 ml
1 M Tris-HCl pufr	1,87 ml
10 % SDS	50 µl
20 % APS	12,5 µl
TEMED	12,5 µl

Rozdělovací gel pro SDS-PAGE 15 %:

pH 8,8

30 % roztok akrylamidu	2,5 ml
Destilovaná voda	0,55 ml
1 M Tris-HCl pufr	1,87 ml
10 % SDS	50 µl
20 % APS	12,5 µl
TEMED	12,5 µl

Roztok I:

pH 8,0

Glukosa	50 mmol/l
Tris-HCl	25 mmol/l
EDTA	10 mmol/l

Steriluje se autoklávováním (0,12 MPa, 20 minut). Uchovává se při 4 °C.

Roztok II:

NaOH	0,2 mmol/l
SDS	1% (w/v)

Roztok III:

5 mol/l octan draselný	60 ml
Ledová kyselina octová	11,5 ml
Voda	28,5 ml

Uchovává se při 4 °C.

TB pufr:

HEPES	10 mmol/l
CaCl ₂	15 mmol/l
KCl	250 mmol/l

- pH se upraví na 6,7 pomocí 1 M KOH a poté se přidá MnCl₂ do výsledné koncentrace 55 mmol/l.

Roztok se sterilizuje filtrací přes filtry o velikosti pórů 0,45 µm.

TBE pufr: pH 8,3

Tris	90 mmol/l
Kyselina boritá	90 mmol/l
EDTA	2 mmol/l

TCT pufr:

Tris-HCl	150 mmol/l
CaCl ₂	10 mmol/l
Tween 20	10 mmol/l

TE pufr: pH 8,0

Tris-HCl	10 mmol/l
EDTA	1 mmol/l

TN pufr: pH 8,0

Tris-HCl	50 mmol/l
NaCl	300 mmol/l

TNI pufr: pH 8,0

Tris-HCl	50 mmol/l
NaCl	300 mmol/l
Imidazol	250 mmol/l

TNE pufr: pH 8,0

Tris-HCl	50 mmol/l
NaCl	150 mmol/l
EDTA	1 mmol/l

Tris-glycinový pufr: pH 8,3

Tris	25 mmol/l
Glycin	250 mmol/l
SDS	0,1 % (w/v)

Uchovávací roztok pro SDS-PAGE:

Methanol	25 ml
Voda	450 ml
Glycerol	25 ml

UT pufr: pH 8,0

Močovina	8 mol/l
Tris-HCl	50 mmol/l

UTN-A pufr (ekvilibrační pufr pro DEAE-Sepharosu): pH 8,0

Močovina 8 mol/l

Tris-HCl 50 mmol/l

UTN-B pufr (eluční pufr pro DEAE-Sepharosu): pH 8,0

Močovina 8 mol/l

Tris-HCl 50 mmol/l

NaCl 200 mmol/l

UTNI pufr: pH 8,0

Močovina 8 mol/l

Tris-HCl 50 mmol/l

NaCl 300 mmol/l

Imidazol 250 mmol/l

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE: pH 6,8

Tris-HCl 50 mmol/l

DTT 100 mmol/l

SDS 2 % (w/v)

Bromfenolová modř 0,1 % (w/v)

Glycerol 10 % (v/v)

Roztok se uchovává zamražený při teplotě -20 °C. Před použitím se přidá β -merkaptoethanol do výsledné koncentrace 10 % (v/v).

Zaostřovací gel pro SDS-PAGE 5 %: pH 6,830 % roztok akrylamidu 266 μ l

Destilovaná voda 1,23 ml

1 M Tris-HCl pufr (pH 6,8) 200 μ l10 % SDS 60 μ l20 % APS 20 μ lTEMED 5 μ l

5.7 Syntetické oligonukleotidy

Oligonukleotidy byly dodány jako jednovláknová DNA v lyofilizované formě (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR). Pro následné použití ke vkládání do plasmidové DNA byly rozpuštěny v TE pufru na výslednou koncentraci 100 μ M. Směs dvou komplementárních

oligonukleotidů byla inkubována při teplotě 70°C po dobu 10 minut a poté pozvolna ochlazena na pokojovou teplotu. Tímto způsobem byly oligonukleotidy převedeny na dvouvláknovou formu DNA. Pro použití k sekvenaci DNA byly oligonukleotidy rozpuštěny v TE pufru na výslednou koncentraci 10 pmol/μl.

Tab. 3: Použité oligonukleotidy

Oligonukleotidy použité pro amplifikaci sekvence pro SPM a jejích delečních variant	
GSTSPM_for	5'CCCATATGTCCCCTATACTAGGTTATT 3'
GSTSPM ₁₃₄ _rev	5'CCCTCGAGATAGGCGAGATCCAAAG 3'
GSTSPM ₁₅₃ _rev	5'CCCTCGAGATAGCTGCCTTGCTGAG 3'
GSTSPM ₁₆₀ _rev	5'CCCTCGAGGGTTGTACCGTCTGTTTTGGT 3'
GSTSPM ₁₆₅ _rev	5'CCCTCGAGATCCCCCATTTTTGCGG 3'
GSTSPM ₁₆₆ _rev	5'CCCTCGAGTAAATCCCCCATTTTTGC 3'
GSTSPM ₁₆₇ _rev	5'CCCTCGAGAAGTAAATCCCCCATTTTT 3'
GSTSPM ₁₆₈ _rev	5'CCCTCGAGTAAAAGTAAATCCCCCATT 3'
GSTSPM ₁₆₉ _rev	5'CCCTCGAGTGCTAAAAGTAAATCCCC 3'
GSTSPM ₁₇₀ _rev	5'CCCTCGAGGGCTGCTAAAAGTAAATCC 3'
GSTSPM ₁₇₅ _rev	5'CCCTCGAGGCTGTGCAGATTGTCCG 3'
GSTSPM ₁₇₇ _rev	5'CCCTCGAGGAAGCGGCTGTGCAGA 3'
GSTSPM ₂₃₉ _rev	5'CCCTCGAGCCATTTGTGAATCAAATTA 3'
Oligonukleotidy použité pro bodovou mutagenezi kodonů pro Asp v pozicích 1 a 165 SPM	
SPM ₁₋₁₆₄ _for	5'CCGCTAGCGACCCCCTTGCCCTAGAT 3'
SPM ₁₋₁₆₄ _rev	5'CCCTCGAGCCCCATTTTTGCGGTTGTA 3'
SPM ₁₆₅₋₂₄₄ _D165E_for	5'CCCTCGAGGAATTACTTTTAGCAGCCGA 3'
SPM ₁₆₅₋₂₄₄ _D165N_for	5'CCCTCGAGAACTTACTTTTAGCAGCCGA 3'
SPM ₁₆₅₋₂₄₄ _D165A_for	5'CCCTCGAGGCTTTACTTTTAGCAGCCGA 3'
SPM ₁₆₅₋₂₄₄ _rev	5'CCCTCGAGTTCCGCCCATTGTGAATCAAATT 3'
SPMD414A_rev	5'CCGCTAGCGGGGCGCTAGTTGAAC 3'
SPMD414E_rev	5'CCGCTAGCGGGGCCCTAGTTGAAC 3'
SPMD414N_rev	5'CCGCTAGCGGGTTGCTAGTTGAACC 3'
Oligonukleotidy použité pro bodovou mutagenezi kodonů v N –koncovém oktapeptidu SPM	
oktaV2_for	5'CCGGATCCAGCGACCCGCTAGCCGTT 3'
oktaI_for	5'CCGGATCCAGCGACCCGCTAATACT 3'

oktaVV_for	5'CCGGATCCAGCGACCCGCTAGTTGTT 3'
oktaLTT_for	5'CCGGATCCAGCGACTTACTAACACT 3'
oktaTF_for	5'CCGGATCCAGCGACCCGCTAACATTT 3'
oktaV1_for	5'CCGGATCCAGCGACCCGCTAGTTCT 3'
oktaVF_for	5'CCGGATCCAGCGACCCGCTAGTTTTT 3'
Oligonukleotidy použité pro amplifikaci genů pro ApfA, ApxA a TbpB	
<i>apfA_for</i>	5'GGTCTAGAATGCAAAAATTAAGTCTTATT 3'
<i>apfA_rev</i>	5'GGCATATGATTTGATGCGCAGAAATTT 3'
<i>apxIA_for</i>	5'GGGTCGACACGCTAACTCTCAGCTCGATA 3'
<i>apxIA_rev</i>	5'GGGCGGCCCGCAGCTGCTTGTGCTAAAGAA 3'
<i>apxIIA_for</i>	5'CCGTCGACACTCAAAAATCACTTTGTCATCA 3'
<i>apxIIA_rev</i>	5'CCGCGGCCCGCAGCGGCTCTAGCTAATTG 3'
<i>apxIIIA_for</i>	5'GGGTCGACACAGTACTTGGTCAAGCATGTT 3'
<i>apxIIIA_rev</i>	5'GGGCGGCCCGCAGCTGCTCTAGCTAGGTTA 3'
<i>apxIVA_for</i>	5'CCGTCGACACACAAAATTAAGTATGCAAGA 3'
<i>apxIVA_rev</i>	5'CCGCGGCCCGCTAAAGCAGCTGTAAAGCTATT 3'
<i>tbpB_for</i>	5'CCGTCGACACTCTGGCGGAAAAGGAAGTT 3'
<i>tbpB_rev</i>	5'CCGCGGCCCGCTTTTTTTTACTTGTTGTTTTGCA 3'
Oligonukleotidy použité pro deleční mutagenезi sekvence genu pro SPM_{IV}	
GSTSPM _{IV} _for	5'CCCATATGTCCCCTATACTAGGTTATT 3'
SPM _{IV244} _for	5'ACGATCCGCTAGCTTTAGATTTAGATGGA 3'
SPM _{IV134} _rev	5'CCCTCGAGATAGGCGAGATCCAAAG 3'
SPM _{IV153} _rev	5'CCCTCGAGATAGCTGCCTTGCTGAG 3'
SPM _{IV168} _rev	5'CCCTCGAGTAAAAGTAAATCCCCCATT 3'
SPM _{IV169} _rev	5'CCCTCGAGTGCTAAAAGTAAATCCCC 3'
SPM _{IV177} _rev	5'CCCTCGAGAAATCGGCTATAAAACGGG 3'
SPM _{IV239} _rev	5'CCCTCGAGGCCTCAGAAAGTGCGG 3'

Podtržením jsou vyznačena zásahová místa pro restriční endonukleasu, s jejímž využitím byly jednotlivé geny, či jejich části vneseny do příslušných expresních vektorů.

5.8 Použitá kultivační média

5.8.1 KULTIVAČNÍ MÉDIA PRO BAKTERIÁLNÍ KULTURY

5.8.1.1 *Tekutá kultivační média*

LB médium (Luria-Bertani médium):

Bacto-tryptone	10 g
Kvasničný extrakt	5 g
NaCl	10 g
Deionizovaná voda	do 1000 ml

MDO médium:

NaH ₂ PO ₄	1 g
Na ₂ HPO ₄	3 g
NH ₄ Cl	2 g
Na ₂ SO ₄	0,5 g
Thiamin	10 mg
Kvasničný extrakt	20 mg
Glycerol	20 mg
Deionizovaná voda	do 1000 ml

- pH se upraví na výslednou hodnotu 7,0 pomocí 5 mol/l NaOH. Steriluje se autoklávováním (0,12 MPa, 20 minut).

SOB médium:

Bacto-tryptone	20 g
Kvasničný extrakt	5 g
NaCl	0,6 g
KCl	0,2 g
Deionizovaná voda	ad 990 ml

Steriluje se autoklávováním (0,12 MPa, 20 minut). Poté se přidá 10 ml sterilního roztoku 1 mmol/l MgCl₂ a 1 mmol/l MgSO₄.

Takto připravená média se pro další používání uchovávají při 4 °C.

Médium s ampicilinem:

Připraví se médium (LB médium nebo MDO médium). Po sterilaci a vychladnutí se k médiu přidá ampicilin do výsledné koncentrace 150 µg/ml.

Médium s kanamycinem:

Připraví se příslušné médium (LB médium nebo MDO médium). Po sterilaci a vychladnutí se k médiu přidá kanamycin do výsledné koncentrace 60 µg/ml.

Médium s tetracyklinem:

Připraví se příslušné médium (LB médium nebo MDO médium). Po sterilaci a vychladnutí se k médiu přidá tetracyklin do výsledné koncentrace 12,5 µg/ml.

5.8.1.2 Tuhá kultivační média**LB médium s ampicilinem:**

Připraví se LB médium a před sterilací se do média přidá 18 g/l bakteriologického agaru a po sterilaci a vychladnutí se k médiu přidá ampicilin do výsledné koncentrace 150 µg/ml.

LB médium s kanamycinem:

Připraví se LB médium a před sterilací se do média přidá 18 g/l bakteriologického agaru a po sterilaci a vychladnutí se k médiu přidá kanamycin do výsledné koncentrace 60 µg/ml.

LB médium s tetracyklinem:

Připraví se LB médium a před sterilací se do média přidá 18 g/l bakteriologického agaru a po sterilaci a vychladnutí tetracyklin do výsledné koncentrace 12,5 µg/ml.

Columbia agar

Tuhé kultivační médium Columbia agar base s přidavkem 10 µg/ml β-NAD.

Složení:

Enzymový hydrolyzát kaseinu	10 g/l
Enzymový hydrolyzát zvířecích tkání	5 g/l
Enzymový hydrolyzát srdeční svaloviny	3 g/l
Kvasničný extract	5 g/l
Škrob	1 g/l
Chlorid sodný	5 g/l
Bakteriologický agar	13 g/l

- doplnit vodou do 1000 ml. Upravit pH na $7,3 \pm 0,2$ (25°C).

Steriluje se autoklárováním (0,12 MPa, 20 minut). Před zatuhnutím se do zchladlého média přidá sterilní β-NAD do výsledné koncentrace 10 µg/ml.

Pozn. Krevní agar č. 4 se připraví smícháním 5-ti ml čerstvé prasečí krve s 95 ml sterilního tuhého kultivačního media ochlazeného na 50°C.

5.8.2 OSTATNÍ KULTIVAČNÍ MÉDIA

Columbia broth

Tekuté médium Columbia broth – obohaceno o 1% IsoVitaleX (BBL) a 10 µg/ml β-NAD.

Složení:

Enzymový hydrolyzát kaseinu	5 g
Enzymový hydrolyzát zvířecích tkání	5 g
Pepton	10 g
Enzymový hydrolyzát srdeční svaloviny	3 g
Chlorid sodný	5 g
Dextrosa	2,5 g
L-Cystin	0,1 g
Síran hořečnatý	0,1 g
Síran železnatý	0,02 g
Tris (hydroxymethyl) aminomethan	0,83 g
Tris (hydroxymethyl) aminomethan-HCl	2,86 g
Uhličitan sodný	0,6 g
Upravit na pH 7,3 ± 0.2 (25°C).	

Steriluje se autoklárováním (0,12 MPa, 20 minut). Do zchladlého média se následně přidá sterilní β-NAD do výsledné koncentrace 10 µg/ml.

5.9 **Plasmidy**

Plasmid pET28b (Novagen, USA) nese gen pro rezistenci ke kanamycinu a sekvenční, umožňující produkci rekombinantních proteinů nesoucích C- a/nebo N-terminální histidinovou kotvu.

Plasmid pTZ19R - *frpDC* lokus (Osička et al., 2004) byl použit pro amplifikaci jednotlivých úseků genu *frpC*.

Plasmid pET28b-*frpC*-His (Osička et al., 2004) byl použit pro konstrukci vektoru nesoucího sekvenci kódující SPM_{IV} náhradou za sekvenci kódující SPM v původním *frpC*.

Modifikovaný plasmid pET28b – dHis –MCS –His (Bumba L., MBÚ AV ČR) nese DNA sekvenční kódující fúzní protein, v němž jsou jednotlivé části sekvenční v následujícím

pořadí: sekvence umožňující vnesení N-terminální dvojité histidinové kotvy, sekvence pro mnohočetné klonovací místo a sekvence pro C-terminální jednoduchou histidinovou kotvu.

Plasmidy pET28b-GST-SPM₁₇₇_A4I-His, pET28b-GST-SPM₁₇₇_A4V-His, pET28b-GST-SPM₁₇₇_A4V+L5F-His, pET28b-GST-SPM₁₇₇_A4T+L5F-His, pET28b-GST-SPM₁₇₇_P2L+A4T-His, pET28b-GST-SPM₁₇₇_A4V+L5V-His a pET28b-GST-SPM₁₇₇_L5V-His byly konstruovány vložením amplifikované sekvence SPM nesoucím příslušnou záměnu (viz Tab. 3) do plasmidu pET28b-GST-SPM-His (viz kap. 6.1.1.1.1, Obr. 11B) štěpeného restrikčními endonukleasami *Nhe* I – *Xho* I.

5.10 Bakteriální kmeny

Bakteriální kmen *E. coli* XL1-BlueBlue (Stratagene, USA) (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI^q ZΔM15Tn10(Tet^r)]*) byl používán pro manipulaci plasmidových DNA.

Bakteriální kmen *E. coli* BL21(λDE3) (Novagen, USA) (*F⁻ ompT gal[dcml] [lon] hsdS_B (r_B⁻m_B⁻ E. coli B strain)*) s DE3 λ profágem nesoucím gen pro T7 RNA-polymerasu byl používán pro produkci jednotlivých rekombinantních proteinů.

Jednotlivé sérotypy *A. pleuropneumoniae*, sérotyp 1, 2, 3, 7, 9, 10, 11, 12 byly získány ze sbírky zvířecích patogenních mikroorganismů Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně (Česká Republika) - (CAPM 3800 serovar 7, kmen: AP76, zdroj: plíce - prase (pleuropneumonie)) či jako terénní izoláty získané z prasat uhynulých prokazatelně na respirační onemocnění vyvolané *A. pleuropneumoniae* v zemědělském družstvu v Moravských Prusech (ověřeno serologickými testy). Všechny uvedené sérotypy *A. pleuropneumoniae* byly použity pro izolace chromosomální DNA a *in vivo* čelení experimenty na prasatech.

Staphylococcus aureus Cowan I (CCM 2352; Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno, Česká Republika) byl použit pro detekci kolonií *A. pleuropneumoniae* po čeleních experimentech.

5.11 Metody a pracovní postupy

5.11.1 STANOVENÍ POČTU CFU (COLONY-FORMING UNITS)

Počet živých bakteriálních buněk (kolonie tvořících jednotek-CFU) byl stanoven tzv. plotnovou metodou. Kultura bakterií v příslušném tekutém médiu o optické hustotě 0,6 měřené při vlnové délce 600 nm (O.D.₆₀₀ = 0,6) byla naředěna v desítkové ředící řadě a každé ředění bylo vyneseno v triplicátu na plotnu s příslušným tuhým kultivačním médiem.

Po inkubaci při 37 °C trvající 16 hodin byly spočteny CFU na jednotlivých plotnách. Ve výpočtu uvedeném níže byl použit průměrný počet CFU z trojice ploten o příslušném ředění. Výsledné počty CFU jsou uvedeny jako průměr CFU z ploten o všech ředěních přepočtené na gram mokré váhy bakterií:

$$\sigma \text{ CFU}/0,1 \text{ ml (objem inokula)}/\text{ředění}/\text{g suspenze buněk na ml} = \text{celkový počet CFU}$$

5.11.2 UCHOVÁVÁNÍ BAKTERIÁLNÍCH KMENŮ

Krátkodobě byly kmeny *E. coli* uchovávány při 4 °C na tuhém LB médiu s příslušným antibiotikem. Dlouhodobě pak ve 40 % glycerolu při teplotě – 80 °C. Kmeny *A. pleuropneumoniae* byly uchovávány výhradně ve 40 % glycerolu při teplotě – 80 °C.

5.11.3 PŘÍPRAVA SUPERKOMPETENTNÍCH BUNĚK *ESCHERICHIA COLI*

Na tuhé LB médium s tetracyklinem bylo nanášeno 50 µl suspenze buněk dlouhodobě uchovávaného kmene *E. coli* XL1-BlueBlue, které byly dále kultivovány (37 °C, 16-24 hodin). Poté byly 2 - 3 kolonie *E. coli* z tuhého LB média přeneseny do 50 ml SOB média a po kultivaci bakterií při teplotě 19 °C a dosažení požadované optické density bakteriální kultury ($OD_{600} = 0,6$) byla kultura prudce ochlazená v lázni voda - led a centrifugována (6000 g, 4 °C, 10 minut). Sediment bakteriálních buněk *E. coli* byl resuspendován v 16 ml sterilního ledového TB pufru. Následovala inkubace buněčné suspenze v lázni voda - led (4 °C, 10 minut) a opětovná centrifugace buněk (6000 g, 4 °C, 10 minut). Po odstranění supernatantu byl sediment bakteriálních buněk resuspendován ve 4 ml ledového TB pufru. K buněčné suspenzi bylo přidáno sterilní DMSO do koncentrace 7 % (v/v) a po inkubaci v lázni voda - led (4 °C, 10 minut) byla buněčná suspenze rozplněna po 200 µl do mikrozkušavek a zamrazena v tekutém dusíku. Takto připravené superkompetentní buňky *E. coli* byly dlouhodobě uchovávány při teplotě – 80 °C.

5.11.4 TRANSFORMACE PLASMIDOVÉ DNA DO SUPERKOMPETENTNÍCH BUNĚK

Ke 200 µl suspenze superkompetentních buněk byl přidán 1 µl plasmidové DNA získané minipreparativní izolací, obsah byl šetrně, ale důkladně zamíchán. V případě, že byla transformována DNA získaná ligací, bylo ke stejnému množství superkompetentních buněk přidáno 15 µl ligační směsi DNA. Směs byla inkubována (4 °C, 30 minut) a následně přenesena na 5 minut do vodní lázně o teplotě 37 °C a poté ochlazená v ledu. Po přidání 1 ml tekutého LB média byla kultura dále inkubována (37 °C, 60 minut). Během této doby se plasmid uvnitř transformovaných buněk replikuje a zároveň dochází k produkci určitého množství produktu genu pro rezistenci k danému antibiotiku. V závěru celého procesu bylo

vyseto 50-200 μ l suspenze na tuhé LB médium s příslušným antibiotikem. Buňky byly inkubovány (37 °C, 12-16 hodin).

5.11.5 IZOLACE CHROMOSOMÁLNÍ A PLASMIDOVÉ DNA

5.11.5.1 Izolace chromosomální DNA

Narostlá 50 ml kultura bakteriálních buněk byla centrifugována (12000 g, 4 °C, 1 minuta). Supernatant byl odlit a pelet resuspendován v 0,8 ml TNE pufru. Následně bylo přidáno 50 μ l 10 % SDS a 5 μ l RNasy A do výsledné koncentrace 10 mg/ml. Směs byla inkubována po dobu 30 minut při teplotě 42 °C, aby došlo k lýzi buněk a štěpení RNA v nich přítomné. Po uplynutí této doby bylo do směsi přidáno postupně 0,5 ml fenolu a 0,5 ml chloroformu. Směs byla důkladně protřepána a centrifugována (12000 g, 4 °C, 5 minut). Horní vodná fáze byla odebrána a k ní bylo přidáno 70 μ l 3 mol/l octanu sodného a v dalším kroku 700 μ l isopropanolu. Směs byla ponechána 15 minut na ledu a následně centrifugována (12000 g, 4 °C, 10 minut). Supernatant byl odebrán a pelet resuspendován ve 300 μ l TE pufru. Kroky následující od přidavku octanu sodného byly zopakovány ještě jednou. Výsledný pelet byl opláchnut 1 ml 70 % ethanolu, ethanol odstraněn a pelet po odpaření ethanolu resuspendován ve 100 μ l TE pufru. Koncentrace získané DNA byla měřena spektrofotometricky a její čistota byla stanovena z poměru A_{260}/A_{280} .

5.11.5.2 Minipreparace plasmidové DNA

Jednou čerstvě narostlou bakteriální kolonií byly zaočkovány 2 ml LB média s příslušným antibiotikem a byly kultivovány za intenzivního třepání (37 °C, 12-14 hodin). Bakteriální kultura byla centrifugována (12000 g, 20 °C, 60 sekund) a sediment byl solubilizován ve 100 μ l roztoku I, buněčná lyse byla navozena přidavkem 200 μ l roztoku II a promícháním pomalou inverzí. Následně bylo přidáno 150 μ l roztoku III, směs byla promíchána třepáním a inkubována (4 °C, 15 minut). Zbytky buněčných struktur, vysrážené proteiny a chromosomální DNA byly odstraněny centrifugací (12000 g, 4 °C, 15 minut). Supernatant byl převeden do nové mikrozkušavky a plasmidová DNA byla srážena přidavkem stejného objemu isopropanolu (4 °C, 10 minut). Po centrifugaci (12000 g, 4 °C, 15 minut) byl získaný pelet sražené plasmidové DNA promyt 500 μ l 70 % ethanolu. Sediment byl vysušen na vzduchu a rozpuštěn ve 40 μ l TE pufru pH 8,0 s přidavkem termostabilní pankreatické RNasy (20 μ g/ml). Směs byla inkubována (70 °C, 30 minut) a plasmidová DNA byla dlouhodobě uchovávána při teplotě -20 °C.

5.11.5.3 Midipreparace plasmidové DNA

Štěrem bakteriálních kolonií nesoucích požadovanou plasmidovou DNA bylo zaočkováno 50 ml LB média s příslušným antibiotikem a kultivováno (37 °C, 10 hodin). Centrifugací (6000 g, 4 °C, 10 minut) byly odděleny bakteriální buňky a solubilizovány v 1 ml roztoku I. Suspenze buněk byla rozdělena na tři stejné objemové díly. Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 0,5 ml roztoku II a promícháno pomalou inverzí. Vzorky byly inkubovány 5 minut při pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 0,5 ml roztoku III a obsah byl intenzivně promíchán třepáním. Centrifugací (12000 g, 20 °C, 7 minut) byly odstraněny vysrážené proteiny, chromosomální DNA a ostatní buněčné struktury. Supernatant byl převeden do 10 ml zkumavky obsahující 3,5 ml DNA vazebného pufru. Směs byla postupně nanášena na dvě minikolonky s křemičitými mikropartikulemi (Lego kit, TopBio, Česká republika) umístěnými na vakuové odsávačce. Minikolonky s navázanou plasmidovou DNA byly promyty 4 ml promývacího pufru a přeneseny do nové mikrozkušavky. Zbytky promývacího pufru byly odstraněny centrifugací (12000 g, 20 °C, 2 minuty). Plasmidová DNA byla eluována z náplně minikolonky přidáním 50 µl sterilní vody, předeřáté na 50 °C. Plasmidová DNA připravená tímto způsobem byla vysoce koncentrovaná a byla uchovávána při -20 °C. DNA vazebný pufr, promývací pufr a vazebné křemičité mikropartikule jsou součástí komerčně dodávaného kitu pro izolaci plasmidové DNA (Top Bio, Praha, ČR).

5.11.6 MANIPULACE S PLASMIDOVOU DNA

5.11.6.1 Štěpení plasmidové DNA restrikčními endonukleasami

K 0,5 µg plasmidové DNA získané minipreparativní nebo midipreparativní izolací, bylo přidáno: 2 µl příslušného 10x koncentrovaného NEB pufru a 2 µl 10x koncentrovaného BSA. Dále byl ke směsi přidán 0,5 až 1 µl zvolené restrikční endonukleasy a výsledný objem reakční směsi byl dosažen přidáním 10 µl deionizované vody. Takto získaná směs byla inkubována 2 hodiny ve vodní lázni o teplotě optimální pro danou endonukleasu. V případě potřeby byly enzymy s doporučenou reakční teplotou 37 °C inaktivovány zahřátím na 70 °C po dobu 10 minut.

5.11.6.2 Zatupení kohesních konců fragmentů plasmidové DNA

K 20 µl směsi plasmidové DNA, která byla štěpena restrikčními endonukleasami bylo přidáno: 1 µl 10x koncentrovaného NEB pufru (T4 DNA polymerasa je aktivní ve všech čtyřech standardních NEB pufrech), 0,5 µl 4 mmol/l dNTP, 7,5 µl deionizované vody a 1 µl

T4 DNA polymerasy. Po promíchání byla směs inkubována 30 minut při 12 °C. T4 DNA polymerasa byla inaktivována inkubací při 70°C po dobu 10 minut.

5.11.6.3 Ligace fragmentů DNA

Fragment získaný štěpením plasmidové DNA příslušného vektoru byl smíchán s vkládaným DNA fragmentem (oba většinou purifikovány z agarosového gelu) nebo syntetickým oligonukleotidem v molárním poměru 1:10, 3 µl 10x koncentrovaného ligačního pufru a 16 µl deionizované vody. V dalším kroku byl přidán 1 µl T4 DNA-ligasy (5 U) a takto vzniklá reakční směs byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 2 hodin při ligaci DNA s kohesními konci nebo 12 až 16 hodin při ligaci DNA s tupými konci.

5.11.6.4 Amplifikace fragmentů plasmidové DNA

Do tenkostěnné mikrozkušavky určené pro amplifikaci pomocí metody PCR (**P**olymerase **C**hain **R**eaction) bylo k 1 µl templátové DNA (200 ng/µl) přidáno 5 µl 10x koncentrovaného HF Phusion kompletního pufru. Následně bylo přidáno 1,5 µl 10 µmol/l primeru I a 1,5 µl 10 µmol/l primeru II rozpuštěných v TE pufru. Dále bylo přidáno 5 µl 2 mmol/l dNTP, 35,5 µl deionizované vody a 0,5 µl Phusion DNA polymerasy. Templátová DNA byla denaturována zahřátím na 98 °C po dobu 2 minut, dále následoval nastavený cyklus, který se opakoval celkem třicetkrát: 10 sekund při teplotě 98 °C (denaturační fáze), 30 sekund při teplotě 46-58°C dle složení basí amplifikovaného úseku DNA (hybridizační fáze) a 72 °C po dobu 1-5 minut dle délky amplifikované DNA (polymerační fáze). Po proběhnutí všech 30 cyklů byly zkumavky s reakční směsí ponechány 10 minut v PCR přístroji při teplotě 72 °C (dokončení elongace nově vzniklých řetězců) a poté byl jejich obsah ochlazen na 4 °C a podle potřeby buď okamžitě zpracován, či uchováván při teplotě – 20 °C.

5.11.6.5 Elektroforesa DNA fragmentů v agarosovém gelu

Koncentrace agarosového gelu byla volena dle velikosti dělených fragmentů, přičemž ve většině případů byl používán 0,6 % (w/v) a 1 % (w/v) agarosový gel obsahující ethidiumbromid o výsledné koncentraci 0,5 µg/ml. Příprava suspenze: vařením agarosy až do jejího úplného rozpuštění a jejím následným ochlazením na teplotu 50 °C. Takto připravená směs byla nalita do obdélníkové formy z plexiskla asi do výšky 0,5-1 cm. Výška hřebínku pro nanášení vzorků byla nastavena tak, aby dno jamky bylo ode dna formy vzdáleno asi 0,2-0,3 cm. Gel byl vložen do aparatury pro agarosovou elektroforesu a převrstven TBE puforem do výšky asi 2 mm nad gel. Do jamek byl nanesen vzorek DNA a standard k určování velikostí DNA o známých velikostech fragmentů (λ DNA štěpená restriční endonukleasou

Pst I). Zařízení bylo zakryto krytem z plexiskla a na elektrody bylo vloženo napětí o takové velikosti, aby vytvořený potenciálový gradient činil 5 V/cm. Elektroforesa probíhala většinou po dobu 1-2 hodin, poté byla aparatura odpojena od zdroje napětí, kryt byl odebrán a gel vyjmut. Rozdělení jednotlivých DNA fragmentů bylo pozorováno při UV světle. U všech gelů byl pořízen elektroforeogram pomocí CCD kamery.

5.11.6.6 Izolace DNA fragmentů z agarosového gelu

Fragment DNA byl vyříznut z agarosového gelu a přenesen do mikrozkušavky s 900 μ l DNA vazebného pufru (Lego kit, TopBio, Česká republika). Takto připravený vzorek byl inkubován při 50 °C do úplného rozpuštění agarosu. Směs byla nanášena na minikolonku s křemičitými mikropartikulemi (Lego kit, TopBio, Česká republika) a vystavena mírnému podtlaku. Navázaná plasmidová DNA byla dvakrát promyta jedním mililitrem promývacího roztoku (Lego kit, TopBio, Česká republika) a přebytek tohoto roztoku byl odstraněn centrifugací (12000 g, 20 °C, 2 minuty). Plasmidová DNA byla uvolněna z náplně minikolonky přidáním 40 μ l sterilní vody předehřáté na 50 °C. Získané DNA fragmenty byly uchovávány při teplotě - 20°C.

5.11.7 SEKVENACE PLASMIDOVÉ DNA

Plasmidová DNA určená k sekvenaci byla izolována pomocí kitu NucleoSpin (Macherey-Nagel GmbH, SRN) nebo pomocí kitu QIAprep (QIAGEN GmbH, SRN). Sekvence byla provedena Sangerovou metodou kombinovanou s technikou cyklického sekvenování. Bylo použito kitu pro cyklické sekvenování (ABI PRISM Big Dye terminator ready reaction cycle sequencing kit, Applied Biosystems, USA), neznačeného primeru komplementárního k sekvenované DNA a vyhodnocení pomocí DNA sekvenátoru ABI PRISM 377 (Perkin Elmer, USA). Tato část práce byla provedena v sekvenační laboratoři MBÚ AV ČR, Praha (Dr. J. Felsberg).

5.11.8 PRODUKCE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ A PŘÍPRAVA BUNĚČNÝCH EXTRAKTŮ PRO PURIFIKACI

5.11.8.1 *Produkce proteinů v 500 ml třepané kultuře*

Bakterie *E. coli* BL21(λ DE3) byly transformovány plasmidem určeným k expresi požadovaného proteinu a inkubovány na LB plotnách s příslušným antibiotikem. Druhý den byly do 50 ml tekutého MDO média obsahujícího příslušné antibiotikum přeneseny 2 - 3 kolonie pro přípravu matečného inokula (12 - 16 hodin, 37 °C, třepání). Následující den bylo

z noční kultury odebráno 5 ml bakteriální suspenze a těmi bylo zaočkováno 500 ml čerstvého MDO média s příslušným antibiotikem předeřátého na 37 °C. Bakteriální kultura byla inkubována za nepřetržitého třepání při teplotě 37 °C do $O.D_{600} = 0,6$. Poté byla produkce proteinu indukována přidávkem IPTG o výsledné koncentraci 1 mmol/l a kultura byla ponechána růst další 4 hodiny. Kultivace bakterií byla ukončena prudkým ochlazením narostlé bakteriální kultury v lázni voda - led. Následně byly buněčné kultury centrifugovány při 2550 g po dobu 30 minut za stálého chlazení (4 °C), médium bylo odstraněno a buňky byly promyty TNE pufrům.

Pro analýzu množství rekombinantního proteinu v buňkách *E. coli* byl z narostlé bakteriální kultury odebrán vzorek (1 ml), který byl dále centrifugován (10000 g, 4 °C, 1 minuta). Po odstranění supernatantu byl pelet buněk resuspendován ve 200 µl UT pufru. Následně bylo odebráno 20 µl pro analýzu pomocí SDS-PAGE (viz kap. 5.11.10).

5.11.8.2 Izolace proteinů z bakteriální kultury

Narostlá bakteriální kultura byla centrifugována (6000 g, 4°C, 20 minut). Pelet buněk byl resuspendován v příslušném kolonovém pufru (20 ml) a sonikován (50 W, 18 kHz, 4°C, 4×30 sekund s třicetisekundovými přestávkami na chlazení). Zbývající celistvé buňky *E. coli* byly od získaného extraktu odstředěny (6000 g, 4 °C, 5 minut).

5.11.8.3 Příprava cytosolického extraktu

Buněčná suspenze po sonikaci a odstředění celistvých buněk (kap. 5.11.8.2) byla centrifugována (13000 g, 4 °C, 25 minut). Supernatant byl odlit a ihned nanesen na příslušnou matici určenou pro purifikaci daného rekombinantního proteinu.

5.11.8.4 Příprava močovinového extraktu

Supernatant získaný centrifugací (13000g, 4 °C, 25 minut) buněčné suspenze po sonikaci a odstředění celistvých buněk (kap. 5.11.8.2) byl odlit a pelet použit pro izolaci proteinů obsažených v inkluzních tělískách. Membránová frakce byla odmyta a na sediment inkluzních tělísek bylo nasypáno 4,8 g pevné močoviny a přidáno 6 ml TN pufru, tak aby byl výsledný objem směsi 10 ml. Směs byla inkubována při pokojové teplotě 60 minut s občasným promícháním, aby došlo k úplnému rozpuštění močoviny na výslednou koncentraci 8 mol/l. Centrifugací směsi (13000 g, 4 °C, 30 minut) byl získán močovinový extrakt. Pro analýzu na SDS-PAGE byl z močovinového extraktu odebrán vzorek 20 µl.

5.11.9 PURIFIKACE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ

5.11.9.1 *Purifikace iontoměničovou chromatografií na DEAE-Sepharose*

Chromatografická kolona byla důkladně promyta deionizovanou vodou, naplněna 10 ml DEAE-Sepharosy a opět propláchnuta deionizovanou vodou pro odstranění ethanolu, ve kterém je DEAE-Sepharosa uchovávána. Kolona byla ekvilibrována UTN-A pufrem.

Následně byl na takto připravenou kolonu nanesen močovinový extrakt příslušného proteinu. Nenavázané proteiny byly z kolony odstraněny promýváním UTN-A pufrem (25 ml). Eluce byla provedena UTN-B pufrem.

Celistvost a homogenita příslušného rekombinantního proteinu v jednotlivých frakcích eluovaných z DEAE-Sepharosy byla zjištěna pomocí SDS-PAGE (kap. 5.11.10). Z každé frakce byl odebrán vzorek o objemu 20 µl.

5.11.9.2 *Purifikace afinitní chromatografií na imobilizovaném iontu kovu na Ni-NTA agarose*

Množství Ni-NTA agarosy dle objemu vzorku určeného k purifikaci (vaznost: 6 mg proteinu/ml matrice) bylo důkladně promyto vodou a následně ekvilibrováno 8-násobkem objemu náplně kolony UTN-B (denaturační podmínky), či TN (nativní podmínky) pufrem. Nenavázané proteiny byly odmyty 8-násobným množstvím objemu náplně kolony přidavkem ekvilibračního pufru. Zachycený protein byl eluován po 1 ml frakcích 250 mmol/l imidazolem v použitém kolonovém pufru. Množství a čistota proteinu v průběhu všech purifikačních kroků byly kontrolovány pomocí SDS-PAGE (kap. 5.11.10) a koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích byla stanovena metodou podle Bradfordové (kap. 5.11.12).

5.11.9.3 *Purifikace afinitní chromatografií na glutathion agarose*

Množství glutathion agarosy dle objemu vzorku určeného k purifikaci (vaznost: 5 mg proteinu/ml matrice) bylo důkladně promyto vodou a následně ekvilibrováno 8-násobkem objemu náplně kolony pomocí PBS pufru, pH 7,4. Nenavázané proteiny byly odmyty osminásobným množstvím objemu náplně kolony přidavkem PBS kolonového pufru. Zachycený protein byl eluován po 1 ml frakcích redukováným glutathionem o koncentraci 5 mmol/l použitého kolonového pufru. Množství a čistota proteinu v průběhu všech purifikačních kroků byly kontrolovány pomocí SDS-PAGE (kap. 5.11.10) a koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích byla stanovena metodou podle Bradfordové (kap. 5.11.12).

5.11.9.4 Převedení proteinu do požadovaného pufru gelovou permeační chromatografií na Sephadexu G-25

Vzorek proteinu (o maximálním objemu 6 ml na každých 15 ml náplně) byl nanesen na kolonu s 15 ml Sephadexu G-25, která byla ekvilibrována puftrem, do kterého měl být protein pro další experimenty nebo uchovávání převeden. Protein byl eluován stejným puftrem v 0,5 ml frakcích, které byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE (kap. 5.11.10). Celý proces byl prováděn při 4 °C.

5.11.10 ELEKTROFORESA V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU (SDS-PAGE)

K 20 µl vzorku proteinu bylo přidáno 5 µl vzorkového pufru určeného pro elektroforesu v SDS-polyakrylamidovém gelu. Po zahřátí na 100 °C po dobu 5 minut byly takto připravené vzorky nanášeny na gel, sestávající ze zaostřovacího 5 % gelu a ze 7,5 %, 10 % resp. 12,5 % rozdělovacího gelu. Po proběhnutí elektroforesy (8 V/cm² pro zaostřovací gel a 15 V/cm² pro rozdělovací gel) v Tris-glycinovém pufru (pH 8,3) byly rozdělené proteiny v gelu barveny barvicím roztokem po dobu 2 hodin. Poté byly tyto gely odbarveny odbarvovacím roztokem a přeneseny do uchovávacího roztoku, případně vysušeny. Pro porovnání molekulové hmotnosti rozdělených proteinů byl použit standard molekulových hmotností.

5.11.11 WESTERN BLOT

Po skončení elektroforetického dělení vzorků byl z polyakrylamidového gelu odstraněn zaostřovací gel. K přenosu proteinů z polyakrylamidového gelu na nitrocelulosovou membránu pomocí elektrického pole byla použita polosuchá metoda. Přenos proteinů probíhal při konstantní hustotě proudu 0,8 mA/cm² nitrocelulosové membrány po dobu 1 hodiny. Po skončení přenosu proteinů byla nitrocelulosová membrána inkubována v 5 % nízkotučném mléce rozpuštěném v PBS, pH 7,4 přes noc ve 4 °C, čímž došlo k vysycení vazebných míst, do nichž by se následně mohla nespecificky vázat protilátka.

Pro detekci proteinů ve fúzi s histidinovou kotvou následovala inkubace s anti-6xHis monoklonální protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidase, která byla před použitím 3000 x naředěna v roztoku 1% mléka v PBST. Inkubace probíhala 1 hodinu při 37 °C. Po specifické vazbě protilátky byla membrána promyta 4 x 10 minut roztokem PBST.

Pro detekci ostatních proteinů byla membrána inkubována 1 hodinu při pokojové teplotě s příslušnou primární protilátkou (ředění 1:3000). Po vazbě primární protilátky byla membrána promyta v PBST pufru (4 x 5 minut, 25 °C, mírné třepání), čímž došlo k odmytí zbytku nenavázané primární protilátky. Specificky vázaná primární protilátka byla

detekována příslušnou sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou v ředění 1:5000. Po navázání sekundární protilátky byla membrána promyta 4 x 10 minut roztokem PBST.

Vizualizace byla provedena chemiluminiscenční metodou na RTG filmu.

5.11.12 STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ

Ke stanovení koncentrace proteinů ve vzorku bylo použito metody podle Bradfordové. Nejdříve byla v rozmezí 10-100 µg/ml připravena série ředění BSA, který byl použit jako kalibrační standard. K ředění byl použit stejný pufr jako k přípravě měřeného vzorku. Poté bylo k 100 µl jednotlivých ředěných standardů, 100 µl vzorku a 100 µl samotného pufru (referenční standard) přidáno 900 µl činidla Bradfordové. Vzorky byly promíchány a inkubovány při pokojové teplotě 15 minut. Absorbance série standardů a měřeného vzorku byla měřena proti referenčnímu standardu při vlnové délce 595 nm. Nakonec byla stanovena koncentrace proteinu ve vzorku odečtením z proměřené kalibrační křivky.

5.11.13 PŘÍPRAVA SUSPENZE ERYTROCYTŮ

Ke 3 ml vzorku krve bylo přidáno 30 ml TN pufru, vychlazeného na 4 °C a vzniklá směs byla odstředěna (4000 g, 4 °C, 10 minut). Po odstranění supernatantu byly krvinky resuspendovány ve 30 ml TN pufru a znovu odstředěny (4000 g, 4 °C, 10 minut). Tento proces byl ještě dvakrát opakován. Poté byly krvinky resuspendovány ve 30 ml TN pufru. Bylo stanoveno množstvírvinek a to tak, že 100 µl suspenzervinek bylo lysováno 900 µl TCT pufru a množství uvolněného hemoglobinu bylo stanoveno spektrofotometricky měřením absorbance při vlnové délce 541 nm (z čehož bylo vypočítáno množstvírvinek v suspenzi). Suspenzervinek, byla naředěna TN puftrem tak, aby výsledná absorbance nově odebraného alikvotu po přidavku TCT pufru byla 3,0, což odpovídá asi $5 \cdot 10^8$ erytrocytů v 1 ml suspenze. Nakonec byl k takto připravené suspenzi erytrocytů přidán roztok CaCl_2 tak, aby výsledná koncentrace vápenatých iontů byla 2 mmol/l.

5.11.13.1 Stanovení hemolytické aktivity rekombinantních Apx proteinů

K 0,5 ml suspenze erytrocytů bylo přidáno 5 µl močovinového extraktu příslušného ApxA proteinu. Množství přidávaného proteinu bylo určeno stanovením koncentrace metodou podle Bradfordové. Směs byla promíchána a inkubována 5-10 hodin při teplotě 37°C. Jako slepý vzorek byly použity erytrocyty, ke kterým nebyly přidány ApxA proteiny. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány (13000 g, 25 °C, 1 minuta). Supernatant obsahující uvolněný hemoglobin byl odebrán do spektrofotometrické kyvety. Absorbance při 541 nm byla

stanovena proti slepému vzorku. Získané hodnoty absorbance byly přepočteny na koncentraci přidávaného toxinu.

5.11.14 ^1H , ^{13}C NMR SPEKTROSKOPIE

Primární sekvence SPM byla předem známa. Nejprve byly provedeny experimenty nutné pro přiřazení rezonančních frekvencí ve spektru ^1H k jednotlivým jádrům v molekule. Tyto experimenty byly provedeny s isotopově značeným vzorkem proteinu SPM₁₋₁₇₇-His. Samotná práce v prvním kroku obnášela sekvenční přiřazení - tedy zařazení jednotlivých aminokyselin (spinových systémů) do správné posloupnosti - a na základě primární sekvence bylo možné jednotlivé signály přiřadit odpovídajícím jádrům tvořícím páteř proteinu. Dalším krokem bylo přiřazení bočních řetězců s využitím standardního experimentu HCCH-TOCSY, kde byla sledována korelace mezi všemi protony vázanými na uhlíku v rámci každého residua. Na základě získaných experimentálních dat (frekvencí přepočítaných na chemické posuny jader) byla provedena předběžná predikce sekundárních motivů v proteinu.

Dále byla analyzována NOESY spektra (interakce mezi protony blízkými v prostoru) v programu ARIA 2.1 a získané meziatomové vzdálenosti byly použity k výpočtu struktury ve vakuu pomocí protokolů molekulové dynamiky inkorporovaných v programu CNS s následnou rafinací ve vodném prostředí. Celý protokol byl několikrát upravován a opakován, aby bylo dosaženo maximální možné přesnosti.

5.11.15 MANIPULACE S KMENY *A. PLEUROPNEUMONIAE*

5.11.15.1 Příprava bakteriálních kultur A. pleuropneumoniae

Kmeny *A. pleuropneumoniae* byly pěstovány na tuhém kultivačním médiu Columbia agar base (s přidavkem β -NAD do výsledné koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$) po dobu 24 hodin při 37 °C v atmosféře 5 % CO_2 a poté převedeny do tekutého média pro další použití – obohaceno o 1 % IsoVitaleX (BBL) a 10 $\mu\text{g/ml}$ β -NAD. Takto připravené kultury byly ponechány růst do exponenciální fáze (cca 6 hodin), následně pak centrifugovány při 4500 g po dobu 15 minut a resuspendovány ve sterilním PBS (pH 7,2) na požadovanou optickou densitu.

5.11.16 ANALÝSA PRODUKCE PROTEINŮ *A. PLEUROPNEUMONIAE* A DETEKCE SPECIFICKÝCH PROTIŁÁTEK (MYŠÍCH, PRASEČÍCH)

Na ELISA mikrotitrační destičku (Nunc-Immuno, Maxisorp, Dánsko) byl navázán příslušný rekombinantní antigen naředěný, pokud není uvedeno jinak, na koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ v roztoku 0,1 mol/l Na_2CO_3 pH 9,5. Poté byla destička 5x promyta PBST a inkubována 1 hodinu při 37 °C s PBST/BSA a následně 5x promyta PBST. Do každé jamky

bylo přidáno 100 µl hyperimunního séra (kap. 5.11.17.2 a kap. 5.11.17.3) v trojkovém ředění. Destička byla následně inkubována 1 hodinu při 37 °C, promyta 5x PBST a dále inkubována 1 hodinu při 37 °C s anti-myší, resp. anti-prasečí polyklonální protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidasou (ředění 1:5000, resp. 1:1000). Po pětinasobném promytí PBST byla v jednotlivých jamkách stanovena peroxidasová aktivita při 492 nm pomocí substrátu o-fenylendiaminu.

5.11.17 PROTILÁTKOVÁ ODPOVĚĎ A PŘÍPRAVA HYPERIMUNNÍCH SÉR PROTI REKOMBINANTNÍM PROTEINŮM *A. PLEUROPNEUMONIAE*

5.11.17.1 Experimentální zvířata

Veškeré experimenty na zvířatech byly provedeny MVDr. Jiřím Nepeřeným, Ph. D. ve společnosti Bioveta, a. s., Ivanovice na Hané (nakládání s experimentálními zvířaty - viz platná legislativa a interní směrnice Bioveta, a. s.).

ICR outbrední myši (samice; 18-21 g; Hsd:ICR (CD-1[®])) byly získány z lékařské fakulty Masarykovy university, Brno, Česká Republika) a byly použity pro přípravu specifických hyperimunních sér. Myši byly drženy v polykarbonátových klecích na kukuřičné podestýlce (Harlan Teklad, Madison, USA), živené komerční dietou a vodou *ad libitum*. Všechny myši byly sérologicky testovány na přítomnost následujících mikroorganismů: *A. pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma pulmonis*, *Salmonella* spp., myší parvovirus a nejběžnější ekto-, resp. endoparasity a potvrzeny jako negativní.

Pro imunizace a čelení experimenty byla použita prasata jakožto jediný přirozený hostitel *A. pleuropneumoniae*. Všechna zvířata (large white × landrase; obojí pohlaví; stáří osm týdnů; 21-24 kg) pocházela z chovu soukromého chovatele v Těšnovicích, Česká Republika. Tento chov je pravidelně monitorován na přítomnost *A. pleuropneumoniae*, *M. hyopneumoniae*, *Salmonella* spp., virus pseudovztekliny (původcem je Herpesvirus suis), infekce vyvolané PRRS a PCRVII virem. Všechna prasata použitá v jednotlivých experimentech byla před vakcinací serologicky testována na přítomnost sérových protilátek proti *A. pleuropneumoniae*. Tato séra byla následně použita jako preimunní kontrolní séra. Zvířata byla ustájena v kotcích po maximálně čtyřech kusech (klimatizované prostory oddělené antimikrobiálními filtry; komerční dieta a voda *ad libitum*).

Se všemi experimentálními zvířaty bylo nakládáno v souladu s platnými zákony na ochranu zvířat a též dle interních směrnic společnosti Bioveta, a. s, kde byly veškeré *in vivo* experimenty provedeny.

5.11.17.2 Imunizace myši

Pro ELISA analýsu připravených rekombinantních proteinů byla připravena sada hyperimunních myších sér: anti-rApfA, anti-rApxIA, anti-rApxIIA, anti-rApxIIIA, anti-rApxIVA a anti-rTbpB. Myši byly rozděleny do skupin po deseti kusech a imunizovány postupně třemi jednotlivými dávkami příslušného purifikovaného proteinu (2 µg proteinu na dávku) v gelovém adjuvans na bázi hydroxidu hlinitého (ALHYDROGEL, Brenntag Biosector, Denmark) ve dvoutýdenních intervalech. Séra byla odebrána k použití dva týdny po poslední imunizaci. Jedna myš z každé skupiny byla vykřvena za účelem zisku preimunního séra. Specifita všech hyperimunních sér byla následně testována metodou ELISA k vyloučení možných křížových reakcí s vybranými rekombinantními proteiny *A. pleuropneumoniae* (rApfA, rApxIA, rApxIIA, rApxIIIA, rApxIVA and rTbpB) a také s kontaminujícími proteiny *E. coli*.

5.11.17.3 Imunizace prasat

Celkem byly provedeny dva nezávislé experimenty, pro které bylo použito 44 prasat (25 prasat v experimentu 1, 19 prasat v experimentu 2). Zvířata byla náhodně rozdělena do 8 skupin. Prasatům ve skupinách 1-6 byly vnitrosvalově aplikovány purifikované rekombinantní antigeny v olejovém adjuvans dle následujícího schématu: Skupina 1 – 6 prasat v experimentu 1 + 6 prasat v experimentu 2, imunizace rApfA (100 µg v jednotlivé dávce); skupina 2 – 3 prasata v experimentu 1 + 0 prasat v experimentu 2, imunizace rApxIVA (100 µg v jednotlivé dávce); skupina 3 – 3 prasata v experimentu 1 + 0 prasat v experimentu 2, imunizace rTbpB (100 µg v jednotlivé dávce); skupina 4 – 3 prasata v experimentu 1 + 0 prasat v experimentu 2, imunizace kombinací rApxIA + rApxIIA + rApxIIIA (50 µg každého antigenu v jednotlivé dávce); skupina 5 – 3 prasata v experimentu 1 + 4 prasata v experimentu 2, imunizace kombinací rApxIA + rApxIIA + rApxIIIA + rApxIVA + rTbpB (50 µg každého antigenu v jednotlivé dávce); skupina 6 – 3 prasata v experimentu 1 + 4 prasata v experimentu 2, imunizace kombinací rApxIA + rApxIIA + rApxIIIA + rApxIVA + rTbpB + rApfA (50 µg každého antigenu v jednotlivé dávce). O dva týdny později byla všechna prasata revakcinována stejnými dávkami jednotlivých vakcín uvedených v předchozím schématu. Skupině 7 – 3 prasata v experimentu 1 + 4 prasata v experimentu 2, obdržela PBS v olejovém adjuvans a skupina 8 – 1 prase v experimentu 1 + 1 prase v experimentu 2 zůstala nevakcinována.

Post-vakcinační séra ze všech vakcinovaných zvířat byla odebrána den před čelenžním experimentem a testována metodou ELISA (viz kap. 5.11.16) na hladiny protilátek proti všem antigenům použitým v této studii.

5.11.18 ČELENŽNÍ EXPERIMENTY NA PRASATECH

5.11.18.1 Příprava kultury *A. pleuropneumoniae* pro čelenžní experimenty a infekce prasat

Kultura *A. pleuropneumoniae* sérotypu 9 byla připravena způsobem, který byl popsán v kap. 5.11.15.1. Bakterie narostlé v tekutém médiu byly centrifugovány při 4500 g po dobu 15 minut a resuspendovány na požadovanou optickou densitu ve sterilním PBS, pH 7,2. Část takto připraveného vzorku byla vynesena v desítkovém ředění v pentaplikátech na plotny s tuhým médiem (Columbia agar s přídatkem 10 µg/ml β-NAD) a bakterie byly ponechány růst po dobu 24 hodin ve 37 °C v atmosféře 5 % CO₂ za účelem přesného stanovení CFU (viz kap. 5.11.1) v kultuře použité pro infekci. Zbývající část vzorku byla rozdělena do alikvotů o stejném objemu jako vzorek vyneseny na tuhé médium určený pro stanovení CFU. Jednotlivé alikvoty byly aplikovány intranasální sondou všem experimentálním zvířatům vždy 2,5 ml suspenze na každou nosní díрку.

Všechny bakteriální kultury *A. pleuropneumoniae* použité v čelenžních experimentech byly testovány metodou ELISA na produkci ApxIA and ApxIIA toxinů a použity pro infekci pouze pokud byly prokázány jako pozitivní.

5.11.18.2 Stanovení LD₅₀ *A. pleuropneumoniae* pro prasata

Bakterie pro infekci byly připraveny způsobem popsaným v kap. 5.11.15.1. Kultury v exponenciální fázi (O.D.₆₀₅ = 0.8) byly naředěny v PBS, pH 7,2 na konečný objem 2,5 ml a výsledné koncentrace 3×10⁶, 1×10⁷ a 2×10⁸ CFU a aplikovány jednotlivě intranasální sondou čtyřem skupinám čítajícím 4 kusy nevakcinovaných prasat v každé.

5.11.18.3 Infekce prasat

Zvířatům ve skupinách 1-7 byla provedena intranasální čelenž měsíc po první imunizaci. Inokula byla aplikována intranasální sondou (kap. 5.11.18.1). Jednotlivé inokulum obsahovalo LD₅₀ infekční dávku *A. pleuropneumoniae* sérotyp 9 (2×10⁸ CFU v pěti ml) (kap. 5.11.18.2). Po sedm následujících dní byla prasata denně sledována a jejich klinický stav byl hodnocen dle následující stupnice: 0, žádné známky prasečí pleuropneumonie; 1, zvýšená respirace, a/nebo občasný kašel, a/nebo občasné polehávání, a/nebo mírná apatie; 2, abdominální respirace, a/nebo kašel, a/nebo polehávání, a/nebo apatie; 3, dušnost, a/nebo

neustávající kašel, a/nebo polehávání, a/nebo výrazná apatie, a/nebo krvavý výtok z čenichu a/nebo tlamy, a/nebo agónie; 4, smrt. Navíc byla též každý den monitorována i tělesná teplota jednotlivých zvířat.

Přeživší zvířata byla usmrcena 7. den po provedení čelenže a stejně tak jako zvířata uhynulá v průběhu experimentů byla podrobena nekropsii s odběrem plicní tkáně a hodnocením četnosti výskytu typických plicních lézí. Rozsah těchto lézí byl klasifikován způsobem popsaným dříve (van den Bosch a Frey, 2003; Wang et al., 2009) s následujícími modifikacemi: 0, žádné patologické změny; 1, patologické změny postihují maximálně 20% plicního laloku; 2, rozsáhlejší poškození (je zasaženo 21-50% plicní tkáně); 3, těžké poškození (je zasaženo 51-100% plicní tkáně). Patologické změny byly popisovány pro jednotlivé plicní laloky zvlášť (levý a pravý kraniální, střední a kaudální lalok) a následně byla pro každé zvíře ze získaných hodnot vypočtena střední hodnota plicního skóre. Vzorky plicních tkání byly podrobeny též histopatologickým vyšetřením (Institut veterinárního lékařství, Brno, Česká Republika).

5.11.18.4 Reisolace, identifikace a serotypizace *A. pleuropneumoniae*

Pro průkaz či vyvrácení přítomnosti *A. pleuropneumoniae* v odebraných vzorcích plicní tkáně byly tyto otištěny naisky s krevním agarem č. 4 obsahujícím 6 % defibrinovanou beraní krev. Kolonie *A. pleuropneumoniae* byly ponechány růst po dobu 48 hodin při 37 °C v zóně hemolýzy β -hemolytického kmene *Staphylococcus aureus* Cowan I (CCM 2352; Institut veterinárního lékařství, Brno, Česká Republika). Následná identifikace kolonií *A. pleuropneumoniae* byla provedena pomocí komerčního testu API NH v3.0 (bioMérieux, Durham, USA) a sérotyp zjištěn serotypizací koaglutinačním testem dle Mittala (Mittal, 1993) v modifikaci dle Kucerova et al., 2005 (Kucerova, 2005) a metodou PCR (Chiers, 2001).

6 VÝSLEDKOVÁ ČÁST

6.1 Výsledky studia bakterie *N. meningitidis*

6.1.1 STUDIUM VZTAHU STRUKTURY A FUNKCE SPM PROTEINU FRPC

6.1.1.1 Autokatalytické štěpení molekuly FrpC

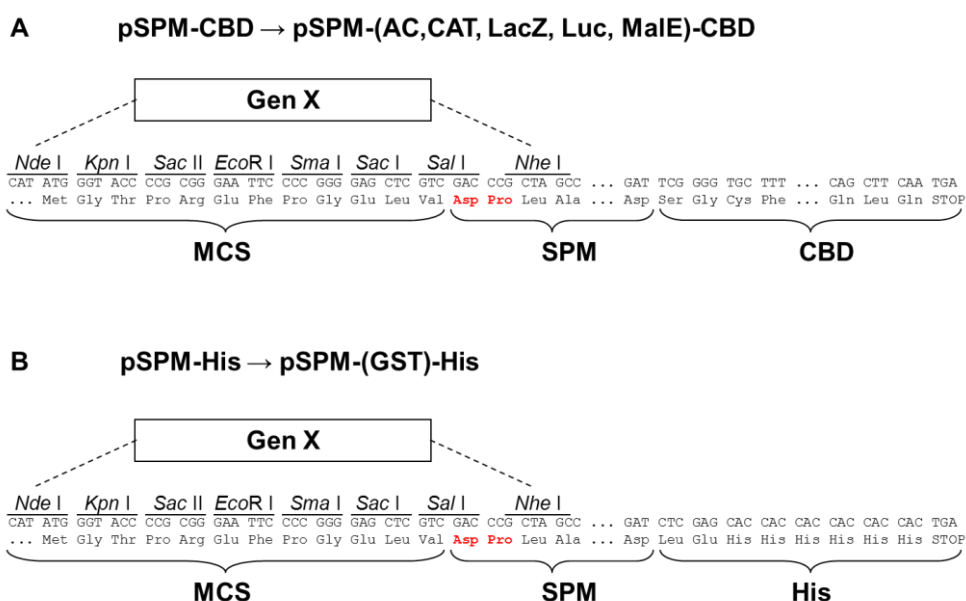
Jak bylo popsáno v sekci literární úvod, dochází již při fyziologických koncentracích vápenatých iontů k vysoce účinnému a specifickému autokatalytickému štěpení molekuly FrpC proteinu a to konkrétně mezi aminokyselinovými zbytky v pozici Asp₄₁₄-Pro₄₁₅. Průběh tohoto procesu není možné zablokovat žádnými známými inhibitory proteas (viz kap. 3.3.3.2). Dále dochází za běžných fyziologických podmínek k tvorbě vyšších molekulových forem štěpeného rekombinantního proteinu, a to vznikem kovalentní vazby mezi karboxyskupinou volného C-koncového aspartátového zbytku D₄₁₄ nově vzniklého amino-terminálního fragmentu FrpC₁₋₄₁₄ a ε-aminoskupinou interního lysinového zbytku jiné FrpC molekuly mechanismem popsaným v kap. 3.3.3.2.

Bylo ukázáno, že za autokatalytické štěpení molekuly FrpC je zodpovědná část aminokyselinové sekvence mezi zbytky 414 a 657, pojmenovaná jako samoštěpitelný modul (Self-Processing Module, SPM) (viz kap. 3.3.3.2). Tato vysoce specifická indukovatelná aktivita SPM zde byla dále studována. Cílem této části disertační práce bylo charakterizovat vlastnosti SPM jako potenciálního nového typu samoštěpitelné afinitní kotvy a definovat podmínky, za kterých by bylo možné ji využít k purifikaci rozpustných rekombinantních proteinů. Za tímto účelem byla navržena a zkonstruována řada plasmidů, nesoucích genetickou fúzi 5'-konce sekvence kódující SPM s otevřenými čtecími rámci kódujícími vybrané rekombinantní proteiny a 3'-koncovou fúzí sekvence pro SPM se sekvencemi kódujícími různé typy komerčně dostupných afinitních kotev. Na těchto fúzních proteinech bylo následně testováno (v roztoku, či po vazbě na afinitní matici), zda a s jakou účinností je SPM po indukci štěpení vápenatými ionty schopen odštěpovat rekombinantní proteiny. Pro studium, do jaké míry zůstává zachována též biologická aktivita odštěpovaných proteinů, byly použity enzymaticky aktivní proteiny fúzované s SPM. Tímto způsobem bylo charakterizováno několik velikostně i vlastnostmi odlišných rekombinantních proteinů, aby bylo možné konstatovat, zda může být studovaný purifikační systém použit jako plnohodnotná alternativa systémů stávajících.

Výsledky této studie jsou z části obsahem diplomové práce (Sadílková, 2006).

6.1.1.1.1 Konstrukce expresních vektorů pro produkci fúzních proteinů nesoucích samoštěpitelnou afinitní kotvu založenou na SPM proteinu FrpC

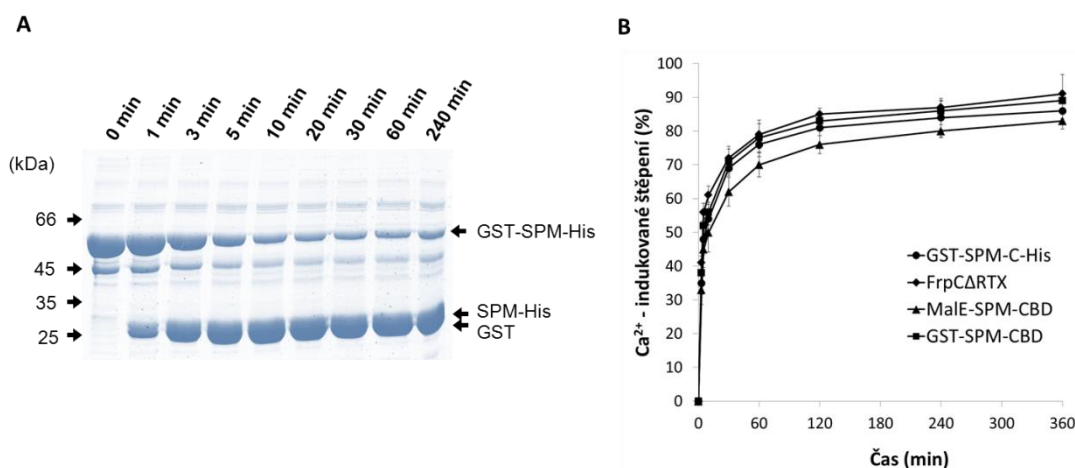
Pro snadné klonování genu pro libovolný rekombinantní protein určený k purifikaci pomocí samoštěpitelné kotvy založené na SPM proteinu FrpC byly připraveny dva typy vektorů, pSPM-His a pSPM-CBD. Oba nesou stejné mnohočetné klonovací místo (Multiple Cloning Site, MCS) s unikátními zásahovými místy pro několik restričních endonukleas (*Nde* I, *Kpn* I, *Sac* II, *EcoR* I, *Sma* I, *Sac* I, *Sal* I, *Nhe* I), do nichž může být gen pro rekombinantní protein klonován tak, aby byl ve fázi čtení se sekvencí kódující SPM a afinitní kotvu. V případě vektoru pSPM-CBD to byla chitin-vázající doména (CBD) a v případě vektoru pSPM-His šest histidinových zbytků (C-His). Produkce fúzních proteinů je u obou vektorů pod kontrolou T7 promotoru a ribosom-vazebného místa z genu 10 bakteriofága T7. Obecné schéma klonovacích míst vektorů pSPM-CBD, resp. pSPM-His je znázorněno na Obr. 11.



Obr. 11: Obecné schéma klonovacích míst vektorů pSPM-CBD, resp. pSPM-His, umožňujících produkci proteinů ve fúzi s SPM a afinitní kotvou. Gen pro SPM je na svém 5'-konci fúzován ve fázi čtení s genem X pro libovolný rekombinantní protein. Tento gen je vkládán do klonovacího místa (MCS) vektoru pSPM-CBD (A) nebo pSPM-His (B). Na svém 3'-konci je gen pro SPM fúzován ve fázi čtení se sekvencemi kódujícími jednotlivé afinitní kotvy (CBD nebo C-His). Exprese fúzních proteinů je pod kontrolou T7 promotoru a ribosom-vazebného místa z genu 10 bakteriofága T7. Červeným písmem jsou zvýrazněny zbytky Asp⁴¹⁴ a Pro⁴¹⁵, mezi nimiž dochází po indukci vápenatými ionty ke štěpení budoucího fúzního proteinu. Odštěpený rekombinantní protein pak na svém C-konci nese navíc pouze jediný aspartátový zbytek (Asp⁴¹⁴) pocházející z SPM.

Jako afinitní kotvy, fúzované k C-koncové části SPM, byly vybrány histidinová kotva (0,8 kDa) a CBD kotva (5,7 kDa), tedy kotvy rozdílné nejen co do velikosti, ale také interagující s jinými typy afinitních matric. Pro ověření univerzálnosti použití vyvíjeného purifikačního systému byl při volbě N-koncových fúzních partnerů SPM proveden co možná nejširší výběr velikostně i vlastnostmi odlišných rekombinantních proteinů. K těm patřily maltosu-vázající protein (MalE), glutathion-S-transferasa (GST), chloramfenikol acetyltransferasa (CAT), β -galaktosidasa (LacZ), luciferasa (Luc), a adenylátcyklasa (AC). Afinitní kotvy i rekombinantní proteiny různého typu i různé velikosti byly vybrány proto, aby bylo možné ověřit, jak typ a velikost SPM fúzních partnerů ovlivní SPM-zprostředkované štěpení fúzních proteinů.

Ze získaných výsledků pro fúzní proteiny GST-SPM-C-His (53 kDa), GST-SPM-CBD (58 kDa) a MalE-SPM-CBD (74 kDa) lze shrnout (Obr. 12), že kinetika štěpení jednotlivých fúzních proteinů v roztoku byla jen minimálně ovlivněna typem rekombinantního proteinu a/nebo afinitní kotvy a velikostí jednotlivých fúzních partnerů. Štěpení studovaných fúzních proteinů probíhalo se stejnou či velmi podobnou účinností jako štěpení původního proteinu FrpCARTX.

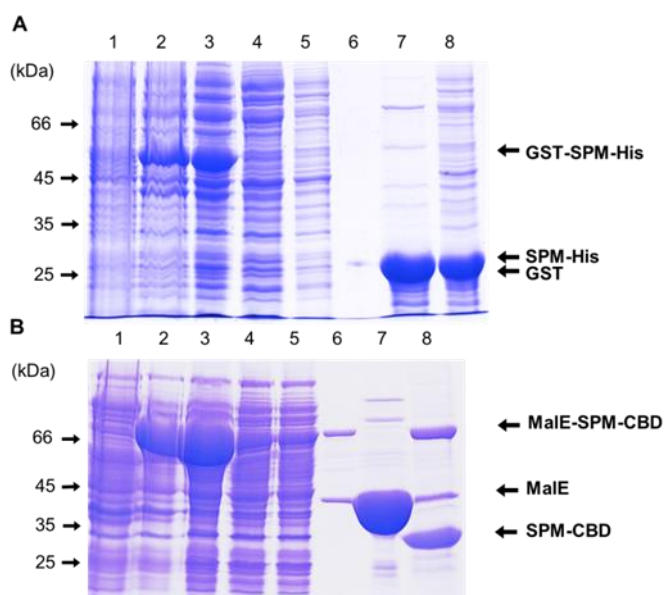


Obr. 12: (A) **Závislost vápníkem-indukovaného štěpení proteinu GST-SPM-CBD na čase.** Purifikovaný fúzní protein GST-SPM-CBD byl štěpen při 37 °C v přítomnosti 2 mmol/l koncentrace vápenatých iontů a v indikovaných časech byly odebrány alikvoty, v nichž byla štěpící reakce zastavena přidavkem vzorkového pufru pro SDS-PAGE s 50 mM EDTA. Produkty štěpení byly děleny pomocí 10% SDS-PAGE a po barvení gelu Coomassie Blue kvantifikovány pomocí densitometrické analýzy. Šipkami jsou vyznačeny jednotlivé velikosti proteinů standardu molekulových hmotností (kDa).

(B) **Závislost vápníkem indukovaného štěpení jednotlivých proteinů na čase.** Data získaná po densitometrické analýze produktů štěpení jednotlivých proteinů byla statisticky vyhodnocena a kinetiky štěpení jednotlivých proteinů jsou vyneseny v grafu.

Každý bod grafu byl získán ze čtyř různých stanovení a je prezentován jako průměrná hodnota \pm standardní odchylka.

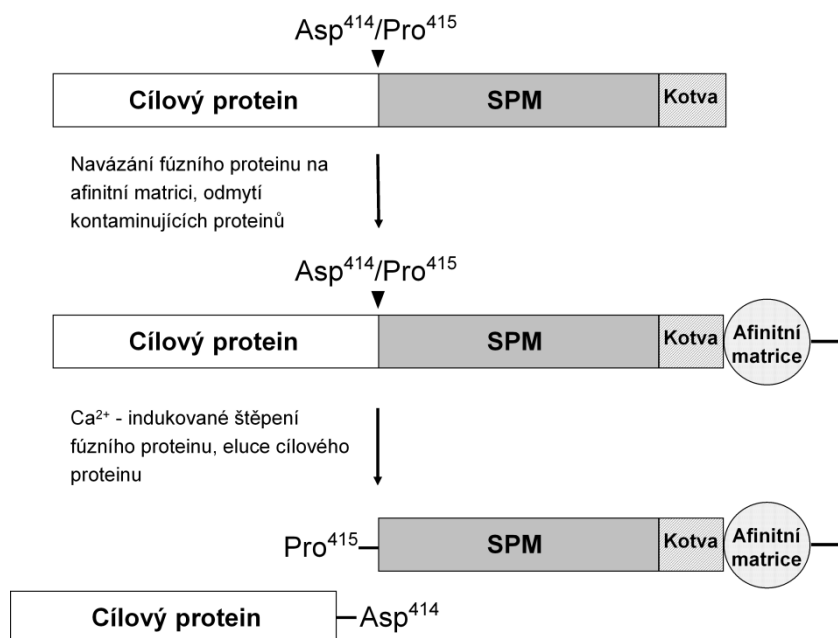
Pokud byly fúzní proteiny GST-SPM-C-His a MalE-SPM-CBD navázány na afinitní matici a pomocí vápenatých iontů bylo indukováno SPM-zprostředkované štěpení vazby Asp⁴¹⁴/Pro⁴¹⁵, docházelo opět k účinnému vyštěpování rekombinantních proteinů GST nebo MalE. V případě GST je možné konstatovat, že jeho vyštěpení na matici bylo stejně účinné, ne-li účinnější než v roztoku, protože po eluci samoštěpitelné afinitní kotvy SPM-C-His a neštěpeného GST-SPM-C-His pomocí 250 mM imidazolu byla pomocí SDS-PAGE téměř výhradně detekována afinitní kotva SPM-C-His (potvrzeno hmotovou spektrometrií) a jen minimum proteinu, který by na základě molekulové hmotnosti odpovídal neštěpené formě GST-SPM-C-His (Obr. 12). U proteinu MalE vyštěpeného z fúzního proteinu MalE-SPM-CBD nebylo možné účinnost štěpení odhadnout, protože k eluci samoštěpitelné afinitní kotvy SPM-CBD a neštěpeného MalE-SPM-CBD nedocházelo ani po přidavku 2% SDS (data nejsou ukázána). Elektroforetická analýza jednotlivých frakcí purifikace GST-SPM-C-His a MalE-SPM-CBD je znázorněna na Obr. 13A, B.



Obr. 13: Elektroforetická analýza jednotlivých frakcí purifikace rekombinantního fúzního proteinu GST-SPM-C-His na Ni-NTA agarose (A), a MalE-SPM-CBD na chitinu (B). Na kolonu byl nanesen cytosolický extrakt obsahující příslušný fúzní protein a po odmytí kontaminujících proteinů bylo indukováno jeho SPM-zprostředkované štěpení pomocí pufru s 10 mM Ca²⁺ a 10 mM DTT. Po ekvilibraci kolony tímto pufrem byla kolona uzavřena a ponechána při pokojové teplotě po dobu 6 hodin a poté byl eluován odštěpený GST, resp. MalE. Nakonec byla z kolony eluována ekvilibračním roztokem s přidavkem 250 mM imidazolu samoštěpitelná afinitní kotva SPM-C-His a neštěpený GST-SPM-C-His, resp. přidavkem 2% SDS samoštěpitelná afinitní kotva SPM-CBD a neštěpený MalE-SPM-CBD.

Alikvoty obou proteinů po všech purifikačních krocích byly děleny pomocí 10% SDS-PAGE a gely byly barveny Coomassie Blue. Jednotlivé frakce: (1) buněčný lyzát *E. coli* BL21/(λDE3); (2) buněčný lyzát *E. coli* BL21/(λDE3) – pET28b-GST-SPM-C-His, resp. – pTYB2-MalE-SPM-CBD, po indukci příslušného fúzního proteinu; (3) cytosolický extrakt; (4) nezachycená frakce; (5) frakce po promytí; (6) frakce obsahující 10 mM Ca^{2+} a 10 mM DTT; (7) protein po odštěpení z fúze eluovaný po 6-ti hodinách od přidavku pufru obsahujícího 10 mM Ca^{2+} a 10 mM DTT; (8) eluce afinitní kotvy a neodštěpeného fúzního proteinu.

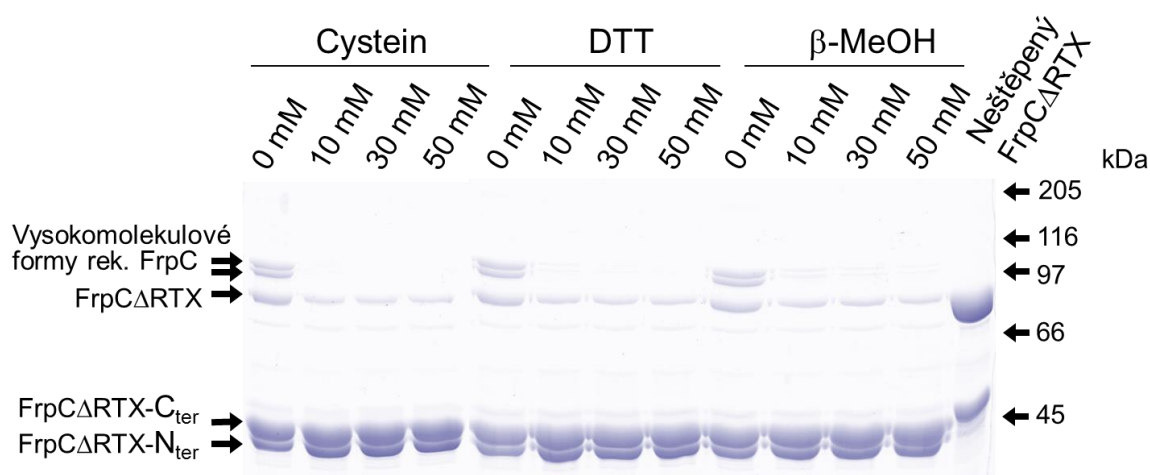
Lze shrnout, že fúze různých rozpustných rekombinantních proteinů s SPM modulem neovlivnila jeho samoštěpící aktivitu. Těto vlastnosti bylo tedy možno využít k jejich afinitní purifikaci a k další optimalizaci purifikačního postupu. Schematické znázornění purifikačního postupu založeného na SPM a libovolné C-terminální afinitní kotvě je uvedeno na Obr. 14.



Obr. 14: **Schéma strategie purifikace rekombinantních proteinů produkovaných v *E. coli* ve fúzi s SPM pomocí afinitní chromatografie.** Gen pro cílový protein určený k purifikaci je fúzován s DNA sekvencí pro SPM a afinitní kotvu a exprimován. Poté je připraven buněčný lyzát, který je nanesen na kolonu s příslušnou afinitní matricí, kde je fúzní protein specificky zachycen a ostatní kontaminující proteiny jsou odmyty. Následně je cílový protein odštěpen z fúzního proteinu přidavkem vápenatých iontů za redukujících podmínek (viz dále) a eluován. SPM a afinitní kotva zůstanou navázány na afinitní matrici.

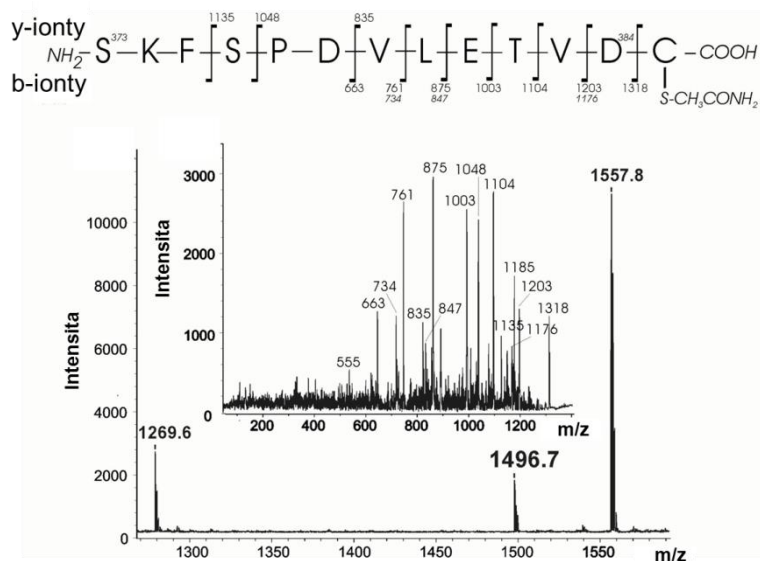
Již dříve bylo pozorováno, že v důsledku SPM-zprostředkovaného štěpení molekuly FrpC dochází k tvorbě extrémně stabilních vysokomolekulových forem rekombinantního proteinu FrpC. Jejich detailní analýza pomocí hmotnostní spektrometrie ukázala, že se 45 kDa

N-koncový fragment proteinu FrpC, vzniklý štěpením vazby Asp⁴¹⁴/Pro⁴¹⁵, může vázat přes C-terminální aspartátový zbytek k ϵ -aminoskupině lysinového zbytku jiné molekuly FrpC prostřednictvím kovalentní isopeptidové vazby. Účinnost tvorby těchto vysokomolekulových forem byla poměrně nízká a docházelo k ní přibližně u 10 % štěpených molekul FrpC. Nedávno bylo zjištěno, že tvorbu vysokomolekulových forem FrpC je možné kompletně inhibovat přidávkem činidel s -SH skupinou jako jsou DTT, β -merkapt ethanol nebo cystein, aniž by docházelo k ovlivnění SPM-zprostředkovaného štěpení (R. Osička, nepublikovaná data). Tvorba podobných vysokomolekulových forem byla pozorována i v případě SPM-zprostředkovaného štěpení zde připravených fúzních proteinů (data nejsou ukázána). Aby se zabránilo tvorbě vysokomolekulových forem a zvýšil se tak výtěžek purifikovaných rekombinantních proteinů, bylo každé SPM-zprostředkované štěpení fúzního proteinu prováděno v přítomnosti pufru s 10 mM DTT, který je dostačující pro kompletní inhibici tvorby vysokomolekulových forem (Obr. 15). Toto pozorování bylo dokumentováno též hmotnostní analýsou fragmentů proteinu AC-SPM-CBD štěpeného v přítomnosti 10 mM Ca²⁺ a 10 mM cysteinu (Obr. 16).



Obr. 15: **Vápníkem-indukovaná samoštěpící aktivita proteinu FrpCΔRTX je nezávislá na tvorbě jeho vysokomolekulových forem.** Purifikovaný protein FrpCΔRTX byl inkubován 1 h při 37°C v nepřítomnosti sloučenin obsahujících thiolovou skupinu (0 mM), nebo v přítomnosti 10 mM, 30 mM, či 50 mM cysteinu, DTT, nebo β -merkapt ethanolu. Přídávkem vápenatých iontů (2 mM) bylo zahájeno štěpení. Fragmenty FrpCΔRTX proteinu v jednotlivých roztocích byly rozděleny pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (7,5%) s následnou vizualizací po barvení Coomassie Blue. V poslední dráze je nanesen purifikovaný FrpCΔRTX inkubovaný 1 h při 37°C v nepřítomnosti vápenatých iontů. FrpCΔRTX-C_{ter} a FrpCΔRTX-N_{ter}, tedy C- či N-koncové fragmenty FrpCΔRTX, jsou

výsledkem vápníkem-indukovaného štěpení FrpCARTX proteinu mezi aminokyselinovými zbytky Asp₄₁₄ and Pro₄₁₅.



Obr. 16: Analýza fragmentů AC-SPM-CBD po štěpení v přítomnosti 10 mM vápenatých iontů a 10 mM cysteinu metodou hmotnostní spektrometrie. Cystein použitý k inhibici tvorby vysokomolekulových forem proteinu AC-SPM-CBD po SPM-zprostředkovaném štěpení se kovalentně váže k C-konci uvolněného AC fragmentu. Přítomnost peptidové frakce, jež velikostně neodpovídá žádnému teoreticky dosažitelnému tryptickému štěpu AC proteinu byla detekována při m/z 1496,7 a její struktura byla určena pomocí deuteriového spektra PSD (Post-Source Decay). Analyzovaný peptid odpovídal C-koncovému peptidu AC, SKFSPDVLETVD, s karbamidomethylovaným cysteinem kovalentně vázaným skrze peptidovou vazbu.

Bylo důležité zjistit, zda po purifikaci pomocí systému využívajícího samoštěpitelnou afinitní kotvu založenou na SPM, zůstane zachována aktivita enzymaticky aktivních proteinů. Pro tento účel byly použity chloramfenikol acetyltransferasa (CAT) a β -galaktosidasa (LacZ). Tyto enzymy byly vybrány proto, že po jejich N- i C-koncové fúzi k jiným proteinům (SPM-C-His, resp. SPM-CBD), dochází pouze k dočasnému snížení jejich aktivity, ale ne k takovým ireverzibilním změnám jejich konformace, které by měly za následek její úplnou ztrátu (Marchesini, 2004; Kenny, 1991; Norton, 1985). Navíc je stanovení jejich specifické aktivity poměrně snadné a reprodukovatelné. Při porovnání specifických aktivit volných forem N-His-CAT i LacZ-C-His purifikovaných konvenční chromatografií s hodnotami získanými pro stejné proteiny po jejich vyštěpení z příslušných fúzních proteinů je zřejmé, že purifikačním postupem na afinitní matici založeným na SPM-CBD nedochází u těchto proteinů ke ztrátě jejich enzymatické aktivity (Tab. 4).

Tab. 4: Srovnání hodnot specifických enzymatických aktivit konvenčně purifikovaných volných proteinů LacZ-C-His a N-His-CAT a aktivit proteinů purifikovaných systémem založeným na samoštěpitelné afinitní kotvě SPM-CBD.

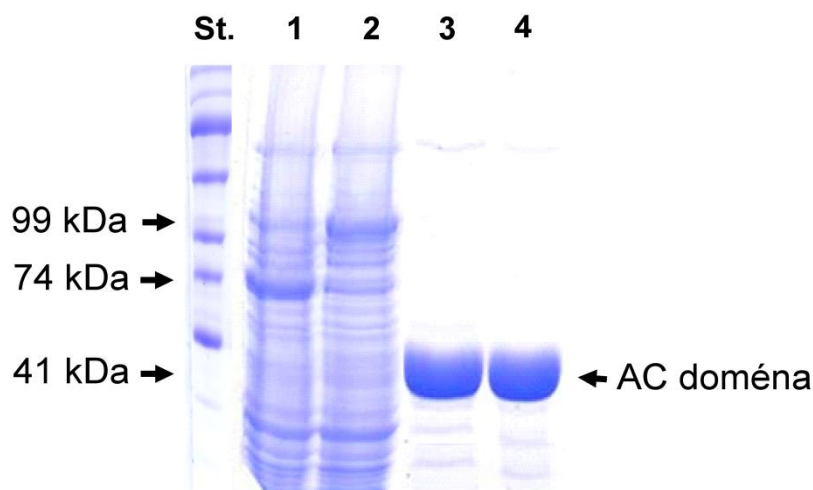
Protein	Specifická aktivita [U/mg]	
	Chromatografie založená na SPM	Konvenční chromatografie
LacZ	1596 ± 23	1606 ± 11
CAT	278 ± 19	290 ± 15

Pro vzájemné porovnání účinností purifikačního systému založeného na SPM se systémem založeným na int-CBD (New England Biolabs), bylo k monitorování jednotlivých purifikačních kroků využito katalyticky aktivní adenylátcyklasové domény (AC) adenylátcyklasového proteinu (CyaA) bakterie *B. pertussis*. Množství AC-SPM-CBD a AC-intein-CBD v cytosolickém extraktu bylo vzato jako výchozí (100 %) a množství příslušného proteinu v ostatních frakcích purifikačního postupu bylo následně vyjádřeno jako procento vztažené k této výchozí hodnotě. Hodnoty získané tímto postupem reprezentují průměr tří nezávislých měření ± standardní odchylka.

Tab. 5: Porovnání účinnosti purifikačního systému založeného na SPM-CBD s komerčně dostupným systémem založeným na int-CBD.

Purifikační krok	Purifikační systém založený na:	
	SPM	Inteinu
Cytosolický extrakt	100 %	100 %
Nezachycená frakce	29 % ± 5 %	30 % ± 6 %
Indukce štěpení	2 % ± 2 %	5 % ± 3 %
Eluce	66 % ± 6 %	61 % ± 7 %

Získané výsledky ukázaly (Tab. 5), že pomocí purifikačního systému založeného na SPM proteinu FrpC je možné purifikovat stejná množství rekombinantního AC proteinu jako pomocí systému založeného na int-CBD. Vzhledem k tomu, že oba systémy využívaly stejné afinitní kotvy (CBD), byla čistota purifikovaného rekombinantního proteinu získaného pomocí obou systémů srovnatelná (Obr. 17).



Obr. 17: Elektroforetická analýza exprese proteinů AC-SPM-CBD a AC-int-CBD a purifikované AC domény. (1) cytosolický extrakt AC-SPM-CBD; (2) cytosolický extrakt AC-int-CBD; (3) AC doména po purifikaci pomocí systému založeného na samoštěpitelné afinitní kotvě SPM-CBD; (4) AC doména po purifikaci pomocí systému založeného na samoštěpitelné afinitní kotvě int-CBD. Vzorky byly děleny pomocí 7,5% SDS-PAGE a gel byl barven Coomassie Blue. (St.) standard molekulových hmotností.

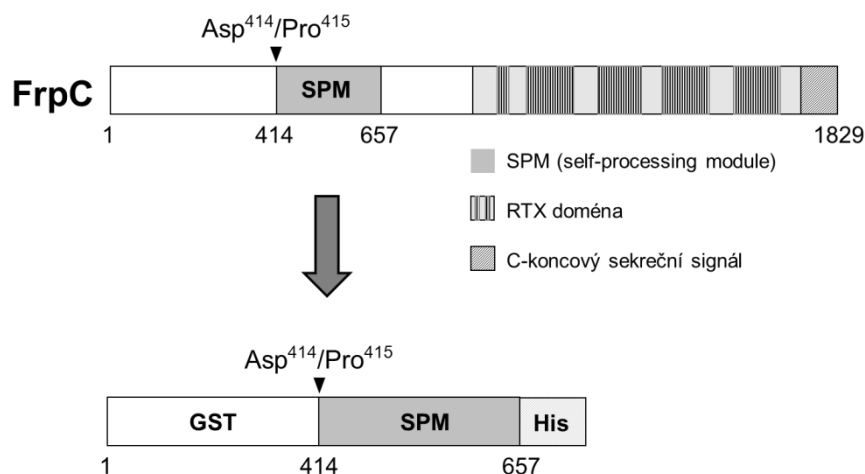
6.1.1.2 Určení minimální části SPM proteinu FrpC nezbytné pro její autokatalytické štěpení

6.1.1.2.1 Predikce nestabilních oblastí v sekvenci SPM pro účely deleční mutagenese

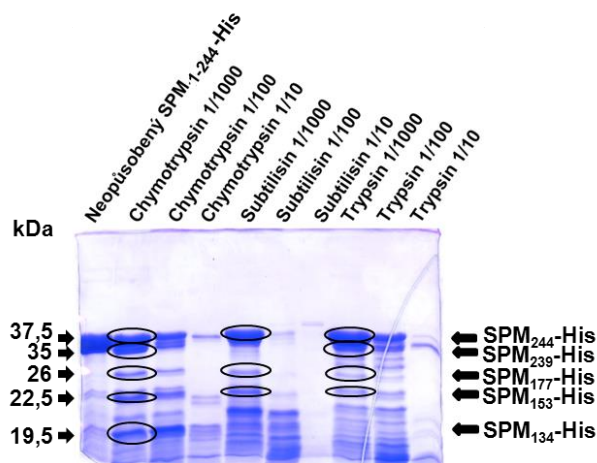
Parciální štěpení se používá k nalezení minimálního kompaktního jádra proteinu. Předpokládá se, že funkční enzym má kompaktní strukturu, jež je nositelem jeho enzymatické aktivity, zatímco pouze částečně strukturované oblasti jeho sekundární sekvence mají jiný význam, např. v kontaktu s buňkami hostitele (Bairoch, 2000; Groves, 1997).

Pro nalezení potenciálně nestrukturovaných částí sekvence SPM proteinu FrpC (Osicka, 2004), tedy oblastí náchylných k ataku proteolytickými enzymy, byl produkován a purifikován do homogenity na koloně Ni-NTA agarosy fúzní protein GST-SPM-C-His (dále pro z přesnění uváděn jako GST-SPM₂₄₄-C-His) (Obr. 18) (Sadilkova, 2008). Samotný SPM₂₄₄ byl v dalším kroku oddělen od fúzní GST kotvy štěpením v roztoku v přítomnosti 10 mM CaCl₂ a 10 mM cysteinu jako redukčního činidla zabraňujícího vzniku vysokomolekulárních forem SPM₂₄₄-C-His uvolněného z fúzního proteinu. Vápenaté ionty i redukční činidlo byly následně odstraněny převedením SPM₂₄₄-C-His proteinu do PBS pufru pomocí gelové permeační chromatografie na koloně naplněné Sephadexem G-25. GST protein byl ze směsi odstraněn vazbou na kolonu GSH agarosy. Výsledný SPM₂₄₄-C-His o koncentraci 1 mg/ml

solubilizovaný v TN pufru s přidavkem 1 mM Ca^{2+} (nutné pro to, aby protein zaujal podobnou konformaci, v jaké by se mohl vyskytovat za fyziologických podmínek v lidském organismu) byl vystaven působení tří různých proteolytických enzymů (trypsin, chymotrypsin, subtilisin) ve třech různých koncentracích a majoritní fragmenty vzniklé štěpením byly následně analyzovány metodou hmotnostní spektrometrie (M. Šulc, MBÚ AV ČR) (Obr. 19).



Obr. 18: Schematické znázornění původní molekuly FrpC a fúzního proteinu SPM₂₄₄ s N-terminálním GST a C-terminální histidinovou kotvou. Sekvence proteinu GST (26 kDa) nahrazuje na N-koncové straně SPM₂₄₄ původní N-terminální fragment FrpC o relativní molekulové hmotnosti 52 kDa. Čísla uvedená u fúzního proteinu GST-SPM₂₅₆-His reprezentují sekvenci SPM s číslováním odpovídajícím původním pozicím aminokyselinových zbytků v molekule celistvého FrpC (414-657).



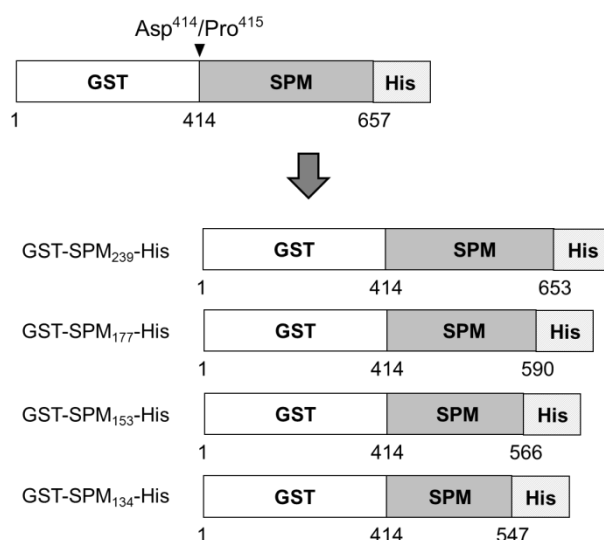
Obr. 19: Proteolytické štěpení SPM₂₄₄-His proteinu pomocí tří zvolených proteas (chymotrypsinu, subtilisinu a trypsinu). Purifikovaný protein SPM₂₄₄-His byl inkubován 1 h při 37°C (v přítomnosti 1 mM Ca^{2+} , bez přidavku redukčního činidla) v přítomnosti různých koncentrací jednotlivých proteolytických enzymů (výchozí koncentrace proteas byla 1 mg/ml; a přidavek byl postupně v ředění 1/10, 1/100 a 1/1000 k SPM o koncentraci 1 mg/ml). Fragmenty SPM₂₄₄-His proteinu v jednotlivých roztocích byly rozděleny pomocí elektroforézy

v polyakrylamidovém gelu (18 %) s následnou vizualizací po barvení Coomassie Blue. V první dráze je nanesen purifikovaný SPM₂₄₄-His inkubovaný 1 h při 37°C pouze v přítomnosti 1 mM Ca²⁺. V pravé části obrázku jsou označeny fragmenty SPM₂₄₄-His (původní celistvá forma) analyzované hmotnostní spektrometrií po izolaci z gelu. Jedná se o následující formy (vyskytují se, až na poslední uvedenou, u všech tří typů štěpení): SPM₂₃₉-His, SPM₁₇₇-His, SPM₁₅₃-His a SPM₁₃₄-His. Odpovídající molekulové hmotnosti jsou vyznačeny po levé straně gelu.

Hmotnostní analýzou fragmentů izolovaných po separaci z polyakrylamidového gelu, a současným porovnáním predikovaných míst v aminokyselinové sekvenci SPM₂₄₄ přístupných štěpení vybranými proteolytickými enzymy (predikce provedena vložením aminokyselinové sekvence SPM₂₄₄ do programu ExPASy Peptide Cutter a vyhledáním všech míst potenciálně štěpitelných účinkem uvedených proteas) byla zjištěna přítomnost čtyř sekvenčních motivů s vysokou pravděpodobností štěpitelných těmito enzymy. Hmotnostní analýza fragmentů po štěpení odhalila, že tyto sekvenční motivy se nacházejí v přístupných oblastech, a že k jejich štěpení skutečně dochází. Výsledkem tohoto štěpení je vznik čtyř majoritních fragmentů SPM₂₄₄ o délce 239, 177, 153 a 134 aminokyselinových zbytků (SPM₁₃₄, SPM₁₅₃, SPM₁₇₇ a SPM₂₃₉) (Obr. 19). Na základě těchto poznatků byla v modifikovaném komerčním expresním vektoru pET28b navržena sada zkrácených variant proteinu SPM₂₄₄-His ve fúzi s GST proteinem určených k nalezení minimální části SPM₂₄₄, která bude ještě schopna v přítomnosti vápenatých iontů štěpit příslušný fúzní protein (Obr. 20).

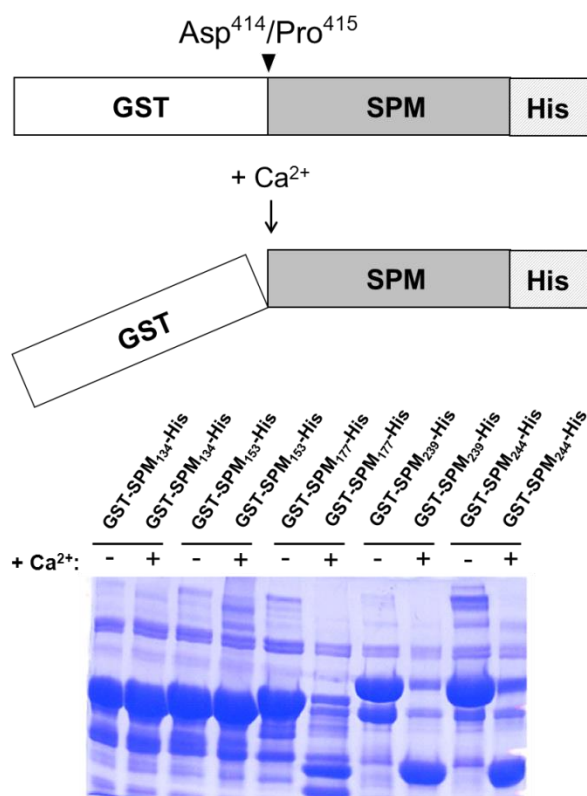
6.1.1.2.2 Deleční mapování minimálního segmentu SPM

Pro přípravu mutantních fúzních proteinů uvedených v předchozí kapitole, byla navržena sada specifických primerů umožňujících amplifikaci vybraného úseku SPM a jeho vložení do vektoru pET28b-GST-SPM₂₄₄-His přes *Xho* I a *Nde* I místa výměnou za původní SPM₂₄₄. Sekvence použitých primerů GSTSPM_for, GSTSPM₁₃₄_rev, GSTSPM₁₅₃_rev, GSTSPM₁₇₇_rev a GSTSPM₂₃₉_rev jsou uvedeny v oddíle Materiály a metody v kap. 5.7. Postup jejich přípravy je podrobně popsán v kapitolách 5.11.4, 5.11.5.2, 5.11.6.4, 5.11.6.6. Restrikční analýza plasmidových DNA po preparaci byla provedena pomocí endonukleasy *Xho* I a *Nde* I, vzniklé fragmenty byly děleny elektroforézou v agarosovém gelu (kap. 5.11.6.5) a po vizualizaci barvením ethidium bromidem byly vybrány správné klony. Jejich správnost byla ještě dodatečně potvrzena sekvenací (kap. 5.11.7). Takto ověřené vektory byly transformovány do buněk *E. coli* BL21/λDE3 umožňujících expresi proteinů (5.11.4).



Obr. 20: Schematické znázornění konstrukce jednotlivých fúzních proteinů nesoucích zkrácené varianty SPM. Původní SPM₂₄₄ byl na základě výsledků predikce a proteolytického štěpení postupně nahrazen jednotlivými zkrácenými úseky SPM₂₃₉, SPM₁₇₇, SPM₁₅₃ a SPM₁₃₄. Všechny uvedené proteiny byly produkovány v buňkách *E. coli* BL21/ λ DE3, purifikovány a následně byla ověřována jejich schopnost odštěpovat v přítomnosti vápenatých iontů fúzního partnera (GST).

Zkrácené varianty GST-SPM₁₃₄-His, GST-SPM₁₅₃-His, GST-SPM₁₇₇-His, GST-SPM₂₃₉-His a kontrolní původní GST-SPM₂₄₄-His byly produkovány v buňkách *E. coli* BL21/ λ DE3 (viz kap. 5.11.8.1 a 5.11.8.2). Cytosolické extrakty byly připraveny způsobem popsáným v kap. 5.11.8.3 a naneseny na jednotlivé kolony Ni-NTA agarosy ekvilibrované kolonovým pufrém (kap. 5.11.9.2). Po odmytí kontaminujících proteinů byly fúzní proteiny eluovány TNE pufrém s přidavkem 250 mM imidazolu a následně převedeny na kolonách naplněných Sephadexem G-25 do TN pufru (kap. 5.11.9.4). Štěpení získaných proteinů bylo provedeno v roztoku v přítomnosti 10 mM CaCl₂ a 10 mM cysteinu po dobu 6 hodin při 37 °C. Vizualizace štěpení byla provedena po rozdělení proteinů elektroforézou v polyakrylamidovém gelu a jejich barvení pomocí Coomassie Blue (kap. 5.11.10). Jak je patrné z obrázku (Obr. 21), proteiny GST-SPM₁₃₄-His a GST-SPM₁₅₃-His neobsahovaly dostatečnou část SPM umožňující odštěpení GST části fúzního proteinu. Na druhé straně GST-SPM₁₇₇-His a GST-SPM₂₃₉-His nesou dostatečně dlouhou sekvenci SPM, která umožňuje účinné štěpení fúzního proteinu. Na základě získaných výsledků byla navržena další sada delečních mutantů SPM pro detailnější mapování sekvence SPM mezi aminokyselinovými zbytky 153-177.



Obr. 21: **Vápníkem-indukované štěpení jednotlivých variant zkrácených fúzních proteinů.** Všechny purifikované proteiny byly inkubovány v roztoku s přidavkem redukčního činidla (10 mM cystein) po dobu 1 h při 37°C (+) v přítomnosti 10 mM Ca^{2+} , či (-) v nepřítomnosti 10 mM Ca^{2+} . Fragменты jednotlivých proteinů byly následně rozděleny pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (10 %) s následnou vizualizací po barvení Coomassie Blue. V posledních dvou drahách je pro srovnání nanesen purifikovaný GST-SPM₂₄₄-His inkubovaný stejným způsobem jako zkrácené fúzní proteiny. Z obrázku je patrné, že k odštěpení GST z fúzního proteinu dochází prostřednictvím SPM o délce 177 aminokyselinových zbytků, ale už ne prostřednictvím SPM o délce 153 zbytků.

6.1.1.2.3 Mapování sekvence mezi aminokyselinovými zbytky v pozicích 153 a 177 SPM

Za účelem nalezení minimální sekvence SPM zodpovědné za autokatalytické štěpení SPM proteinu FrpC byla navržena další sada specifických primerů (GSTSPM₁₆₀_rev, GSTSPM₁₆₅_rev, GSTSPM₁₇₀_rev, GSTSPM₁₇₅_rev – sekvence uvedeny v kapitole 5.7.) umožňujících amplifikaci úseků sekvence kódující SPM různých délek mezi aminokyselinovými zbytky SPM₁₅₃ až SPM₁₇₇. Postup klonování, selekce správných klonů, produkce jednotlivých fúzních proteinů, jejich purifikace a ověření jejich štěpitelnosti bylo provedeno způsobem naprosto identickým s postupem popsáním v předchozích kapitolách (6.1.1.1.1). Z výsledku vápníkem indukovaného štěpení těchto proteinů (Tab. 6) je zřejmé, že poslední aminokyselinový zbytek sekvence SPM proteinu potřebný pro jeho autokatalytickou štěpící aktivitu se nachází mezi zbytky v pozicích 165-170.

6.1.1.2.4 Nalezení minimální části SPM₂₄₄ nezbytné pro jeho autokatalytické štěpení

Pro nalezení aminokyselinového zbytku uzavírajícího část sekvence SPM zodpovědnou za jeho autokatalytickou štěpící aktivitu byla navržena poslední sada specifických primerů GSTSPM_{166_rev}, GSTSPM_{167_rev}, GSTSPM_{168_rev} a GSTSPM_{169_rev}, jejichž přesná sekvence je uvedena v kap. 5.7. Postupem identickým ve výše uvedených kapitolách (6.1.1.1.1 a 6.1.1.2.3) byly získány zkrácené fúzní proteiny, jež byly vystaveny působení vápenatých iontů v přítomnosti redukčního činidla. Účinnosti štěpení jednotlivých fúzních proteinů jsou definovány jako procentuální úbytek celistvé formy příslušného původního neštěpeného fúzního proteinu. Vyhodnocení bylo provedeno denzitometrickou analýsou jednotlivých proteinů a jejich štěpných produktů po rozdělení v polyakrylamidovém gelu a barvení Coomassie Blue (kap. 5.11.10) pomocí programu AIDA. Jak je zřejmé z Tab. 6, délka aminokyselinové sekvence SPM nezbytná pro jeho autokatalytické štěpení je 169 aminokyselinových zbytků.

6.1.1.2.5 Určení teplotní stability jednotlivých variant fúzních SPM proteinů

Pro určení stability jednotlivých zkrácených variant a původního fúzního GST-SPM₂₄₄-C-His byly všechny tyto proteiny purifikovány a následně uchovávány v TNE pufru po dobu 4 týdnů při teplotě 37 °C. Po uplynutí této doby byly z jednotlivých proteinů odebrány vzorky pro analýsu pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu a barvení Coomassie Blue (kap. 5.11.10). Množství původní formy proteinu (výchozí hodnota – 100 %), případně množství fragmentů po degradaci bylo vyhodnoceno densitometricky pomocí programu AIDA. Tyto experimenty ukázaly, že pro vznik stabilní konformace minimálního segmentu SPM jsou potřebné také C-koncové sekvence následující za aminokyselinovým zbytkem v pozici SPM₁₆₉ (spontánní degradace kratších variant SPM – viz Tab. 6). Posledním zkráceným proteinem stabilním po dobu 4 týdnů při teplotě 37 °C byl GST-SPM₁₇₇-C-His (Tab. 6).

Následně bylo způsobem popsáním v předchozím odstavci ukázáno, že k potlačení degradace jednotlivých proteinů lze s úspěchem použít přídatku komerčně dostupné směsi inhibitorů proteas (Complete MiniTM, EDTA-free, Roche, SRN).

Tab. 6: Účinnost štěpení a stabilita jednotlivých variant fúzních proteinů nesoucích zkrácené formy SPM₂₄₄.

Varianta proteinu	Délka SPM (AA)	Aminokyselinová sekvence ve FrpC w.t.	Účinnost štěpení (37 °C)	Stabilita (37 °C, 28 dní)
GST-SPM ₂₄₄ -His	244	414-657	100 %	100 %
GST-SPM ₂₃₉ -His	239	414-653	100 %	100 %
GST-SPM ₁₇₇ -His	177	414-590	100 %	89 % ± 6 %
GST-SPM ₁₅₃ -His	153	414-566	0 %	100 %
GST-SPM ₁₃₄ -His	134	414-547	0 %	100 %
GST-SPM ₁₇₅ -His	175	414-588	98 % ± 3 %	77 % ± 9 %
GST-SPM ₁₇₀ -His	170	414-583	98 % ± 1 %	69 % ± 5 %
GST-SPM ₁₆₅ -His	165	414-578	0 %	100 %
GST-SPM ₁₆₀ -His	160	414-573	0 %	100 %
GST-SPM ₁₆₉ -His	169	414-582	97 % ± 2 %	61 % ± 4 %
GST-SPM ₁₆₈ -His	168	414-581	13 % ± 5 %	86 % ± 5 %
GST-SPM ₁₆₇ -His	167	414-580	0 %	100 %
GST-SPM ₁₆₆ -His	166	414-579	0 %	100 %

Účinnost štěpení a stabilita jednotlivých fúzních proteinů jsou definovány jako procentuální úbytek celistvé formy příslušného původního neštěpeného fúzního proteinu. U těch fúzních proteinů, u kterých je uvedena stabilita menší než 100 % dochází po čtyřtýdenní inkubaci při 37 °C k nespecifické degradaci proteinu. Tento proces lze do značné míry potlačit přidavkem směsi inhibitorů proteas (např. Complete MiniTM, EDTA-free, Roche, SRN). Červeně jsou vyznačeny ty fúzní proteiny, u nichž není sekvence SPM dostatečně dlouhá pro účinné odštěpení GST. Tučným černým písmem je uveden fúzní protein nesoucí SPM₁₆₉, tedy nejkratší varianta SPM, jež je ještě schopna účinně odštěpovat GST.

6.1.1.2.6 Srovnání SPM vs. SPM_{IV} proteinu ApxIVA *A. pleuropneumoniae*

Jak bylo již uvedeno v kap. 3.3.3.2. a v kap. 6.1.1.1., protein FrpC bakterie *N. meningitidis* není jediným známým proteinem nesoucím sekvenci umožňující autokatalytické štěpení molekuly proteinu v přítomnosti vápenatých iontů. Taktéž v případě proteinu ApxIVA bakterie *A. pleuropneumoniae* byl na základě podobnosti primární aminokyselinové sekvence identifikován SPM zodpovědný za vysoce specifické štěpení proteinu za stejných podmínek, za jakých dochází ke štěpení molekuly FrpC (Osicka, 2004).

Jak je patrné z obrázku (Obr. 22), primární aminokyselinové sekvence SPM a SPM_{IV} (označení SPM proteinu ApxIVA) se vyznačující shodou převyšující 55 %, přičemž podobnost obou dosahuje 74 %.

```

SPM FrpC 1 DPLALDLDGDGIETVATKGFSGSLFDH-NRDGIRTATGWAADDGLLVRDLNGNGIIDNG-AELFGD-NTKLADGSF-AKHGYAALAELDSNGD-NI-INA
SPMIV ApxIVA 1 DPLALDLDGDGLETVSMNGRQGALFDHEGK-GIRTATGWLAADDGFLVDRNQDGII-NDISELFSNKN-QLSDGSISA-HGFATLADLDTNQDRIDQN-

SPM FrpC ADAAFQTLRVWQDLNQDGISQANELRTLEELGIQSLDLAYKDVNKN-L-GNGNTLAQQSYTKTDGTTAKMGDLLLAADN-LHSRFKDKVELTAEQAKA-
SPMIV ApxIVA -DKLFSKLQIWRDLNQNGFSEANELFSLESLNIKSLHTAYEERN-DFLAGN-NILAQLGKYEKTDGTFAQMGDLNFSF-NPY-SRFTEALNLTEQQRRTI

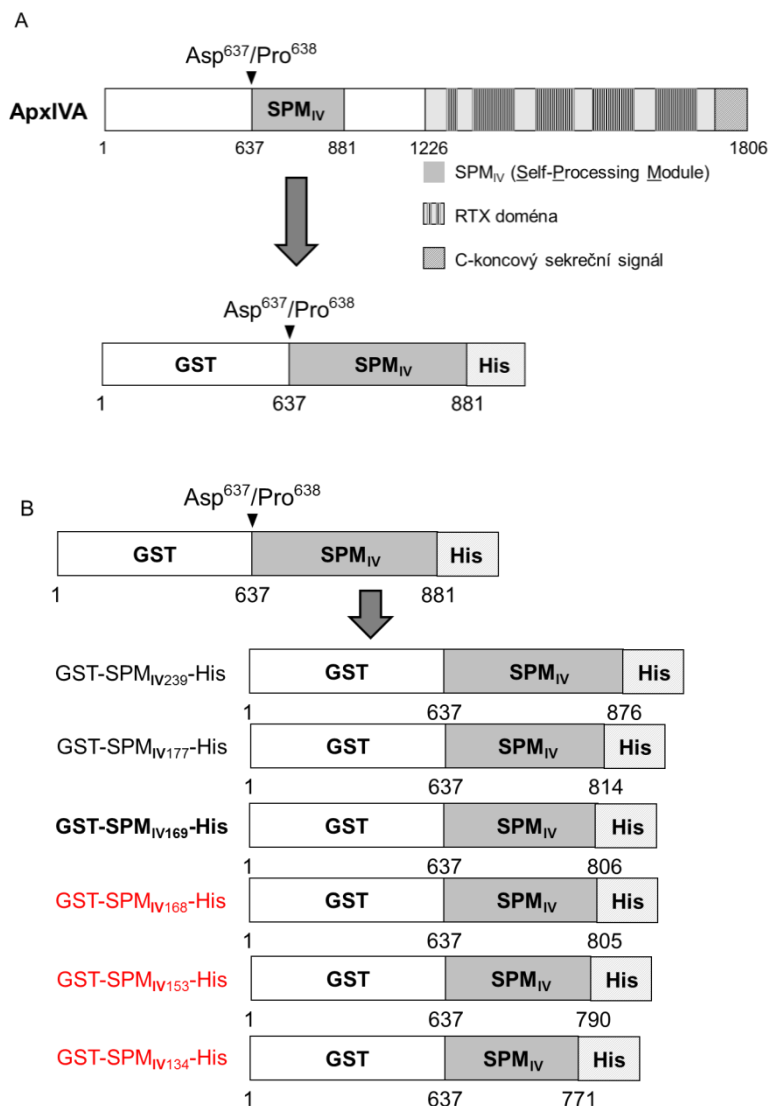
SPM FrpC NLAGIGRLRDLREAAALSGDLANMLKAYS-AAETKEAQLALLDNLIHKWAETD 256
SPMIV ApxIVA NLTGTGRVRDLREAAALSEELAALLQQYTKASDF-QAQRELLPAILDKWATD 256

```

Obr. 22: Srovnání primárních aminokyselinových sekvencí SPM a SPM_{IV} pomocí on-line programu „Pairwise align protein“ (www.bioinformatics.org). Červeně jsou vyznačeny aminokyselinové zbytky, které se v obou proteinech navzájem liší. Černé písmo s podtržením zvýrazňuje aminokyselinové zbytky N-koncového oktapeptidu, modrou barvou je pak označena pozice Asp v pozici 165 SPM, resp. SPM_{IV}.

Vzhledem k uvedeným pozorováním byla identickým způsobem jako v kap. 6.1.1.2.3 – 6.1.1.2.5 navržena sada delečních variant SPM_{IV}. Nejprve byla izolována gDNA *A. pleuropneumoniae* sérotyp 9 postupem popsáným v kap. 5.11.5.1. Pro přípravu mutantních fúzních proteinů, byla navržena sada specifických primerů umožňujících amplifikaci vybraného úseku SPM_{IV244} a jeho vložení do vektoru pET28b-GST-SPM₂₄₄-His přes *Xho* I a *Nde* I místa výměnou za původní SPM₂₄₄ proteinu FrpC. Sekvence použitých primerů, stejně tak jako další postup přípravy uvedených vektorů jsou uvedeny v oddíle Materiály a metody v kap. 5.7, 5.11.4, 5.11.5.2, 5.11.6 a 5.11.7. Fúzní proteiny byly produkovány způsobem popsáným v kap. 5.11.8.1, biomasa byla zpracována dle popisu v kap. 5.11.8.2 a cytosolický extrakt (kap. 5.11.8.3) byl nanesen na kolonu Ni-NTA agarosy umožňující purifikaci požadovaného proteinu (kap. 5.11.9.2). Všechny takto získané proteiny byly převedeny do TN pufru (kap. 5.11.9.4), štěpeny v roztoku v přítomnosti 10 mM Ca²⁺ a 10 mM cysteinu a výsledné produkty štěpení, jakož i jednotlivé kroky purifikačního procesu byly analyzovány elektroforézou v polyakrylamidovém gelu po barvení Coomassie Blue (kap. 5.11.10).

Na obrázku 23A je schematicky znázorněna molekula proteinu ApxIVA, s vyznačením lokalizace sekvence SPM_{IV} v kontextu sekvence celistvého ApxIVA. Na obrázku 23B jsou pak schematicky vyobrazeny všechny připravené fúzní původní i mutantní SPM_{IV} proteiny. Červeně jsou vyznačeny proteiny již neschopné štěpení. Stejně tak jako v případě SPM proteinu FrpC dochází ke štěpení varianty SPM_{IV177} i SPM_{IV239}, ne však již SPM_{IV168}, SPM_{IV153} a SPM_{IV134}. Nejkratší funkční molekulou SPM_{IV} je varianta nesoucí na svém C-konci aminokyselinový zbytek 169 (SPM_{IV169} - tučným černým písmem) (Tab. 7).



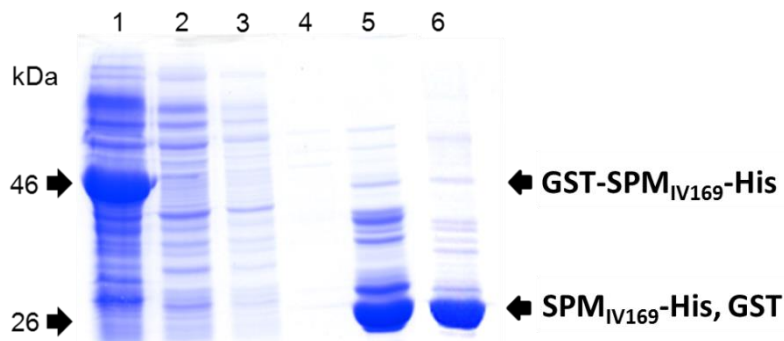
Obr. 23: Schematické znázornění molekuly ApxIVA proteinu, původního SPM_{IV} a jeho jednotlivých delečních variant ve fúzi s GST a C-koncovou histidinovou kotvou. (A) Schematická reprezentace molekuly proteinu ApxIVA s vyznačením sekvence kódující SPM_{IV} v kontextu sekvence molekuly celistvého ApxIVA. (B) Schematické vyobrazení jednotlivých připravených variant fúzního GST-SPM_{IV}-His proteinu. Červeným tučným písmem jsou zvýrazněny fúzní proteiny neschopné vápníkem indukovaného štěpení, černě tučným písmem pak fúzní GST-SPM_{IV}169-His, který je poslední štěpitelnou zkrácenou variantou fúzního proteinu GST-SPM_{IV}244-His.

Tab. 7: Účinnost štěpení a stabilita jednotlivých variant fúzních proteinů nesoucích zkrácené formy původního SPM_{IV244}.

Varianta proteinu	Délka SPM (AA)	Aminokyselinová sekvence v ApxIVA w.t.	Účinnost štěpení (37 °C)	Stabilita (37 °C, 28 dní)
GST-SPM _{IV244} -His	244	637-881	100 %	100 %
GST-SPM _{IV239} -His	239	637-876	100 %	100 %
GST-SPM _{IV177} -His	177	637-814	100 %	92 % ± 5 %
GST-SPM _{IV153} -His	153	637-790	0 %	100 %
GST-SPM _{IV134} -His	134	637-771	0 %	100 %
GST-SPM _{IV169} -His	169	637-806	98 % ± 6 %	54 % ± 14 %
GST-SPM _{IV168} -His	168	637-805	8 % ± 9 %	84 % ± 9 %

Účinnost štěpení a stabilita jednotlivých fúzních proteinů jsou definovány jako procentuální úbytek celistvé formy příslušného původního neštěpeného fúzního proteinu. U těch fúzních proteinů, u kterých je uvedena stabilita menší než 100 % dochází k postupné nespecifické degradaci proteinu. Tento proces lze do značné míry potlačit přidávkou směsi inhibitorů proteas (např. Complete MiniTM, EDTA-free, Roche, SRN). Červeně jsou vyznačeny ty fúzní proteiny, u kterých je sekvence SPM nedostatečně dlouhá k účinnému odštěpení GST. Tučným černým písmem je uveden fúzní protein nesoucí SPM_{IV169}, tedy nejkratší SPM_{IV}, jenž je ještě schopen účinně odštěpovat GST.

Elektroforetická analýza jednotlivých frakcí purifikace proteinu GST-SPM_{IV169}-His na GSH agarose (viz kap. 5.11.9.3) je uvedena v obrázku 24.

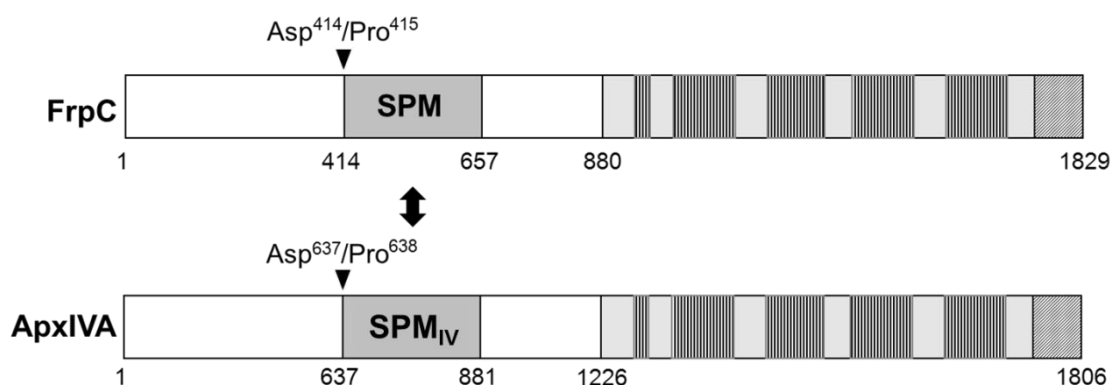


Obr. 24: **Vápníkem-indukované štěpení fúzního proteinu GST-SPM_{IV169}-His na glutathion agarose.** Na kolonu byl nanesen cytosolický extrakt obsahující fúzní protein a po odmytí kontaminujících proteinů bylo indukováno jeho SPM_{IV}-zprostředkované štěpení pomocí pufru s 10 mM Ca²⁺ a 10 mM DTT. Po ekvilibraci kolony tímto pufrům byla kolona uzavřena a ponechána při pokojové teplotě po dobu 6 hodin a poté byl eluován odštěpený SPM_{IV169}-His. Nakonec byl z kolony eluován roztokem 5 mM glutathionu GST protein a neštěpený GST-SPM_{IV169}-His. Alikvoty proteinu po všech purifikačních krocích byly děleny pomocí 10% SDS-PAGE a gel byl následně barven Coomassie Blue. Jednotlivé frakce: (1) cytosolický extrakt; (2) nezachycená frakce; (3) frakce po promytí; (4) záchyt protékající frakce obsahující 10 mM Ca²⁺ a 10 mM DTT; (5) protein po odštěpení z fúze eluovaný po šesti hodinách od přidavku pufru obsahujícího 10 mM Ca²⁺ a 10 mM DTT; (6) eluce afinitní kotvy a neodštěpeného fúzního proteinu.

Tyto výsledky ukázaly, že veškerá strukturní informace pro samoštěpící aktivitu je obsažena v SPM_{IV}¹⁷⁷. Dále pak skutečnost, že poměrně odlišné sekvence SPM proteinu FrpC a SPM_{IV} proteinu ApxIVA nesou charakteristiky, které umožňují autokatalytické štěpení obou uvedených proteinů, naznačuje, že toto štěpení je zcela závislé pouze na přítomnosti původní SPM (FrpC) či SPM-like sekvence (sekvence homologní k SPM) v daném proteinu. Pro ověření této hypotézy byl připraven rekombinantní FrpC nesoucí SPM_{IV} záměnou za původní SPM. O přípravě a štěpení takto připraveného mutantního FrpC je pojednáno v následující kapitole.

6.1.1.2.7 Štěpení varianty proteinu FrpC nesoucí SPM_{IV} proteinu ApxIVA záměnou za SPM proteinu FrpC

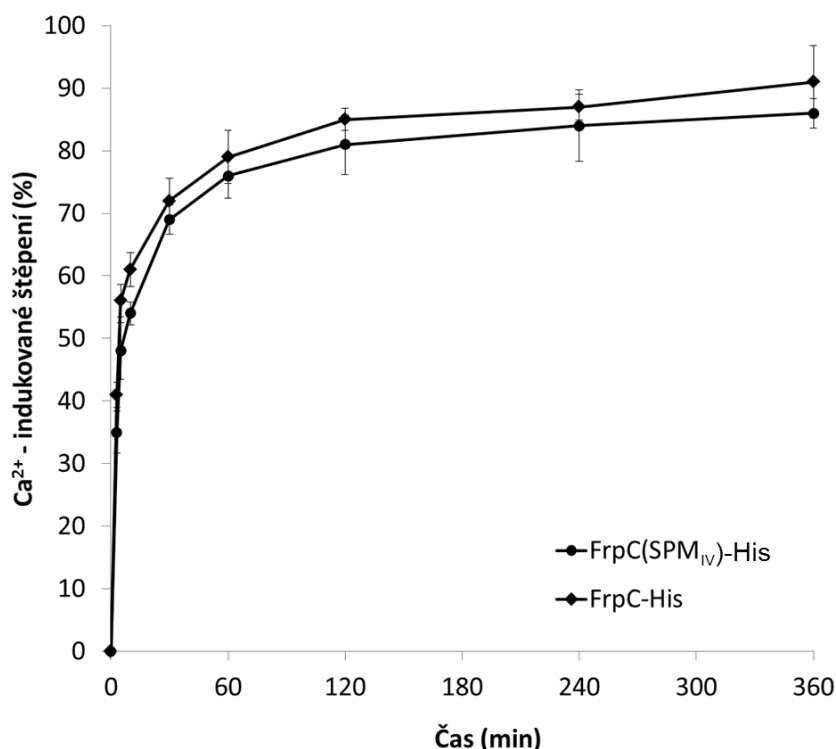
Abychom ověřili funkční zaměnitelnost SPM modulů FrpC a ApxIVA, připravili jsme hybridní formu proteinu FrpC s vloženou sekvencí SPM_{IV} a rozhodli jsme se ověřit štěpitelnost takto připraveného proteinu (kap. 5.7, 5.11.3, 5.11.6.1, 5.11.6.4, 5.11.6.5, 5.11.6.6 a 5.11.6.7) v přítomnosti vápenatých iontů (Obr. 25).



Obr. 25: Schematické znázornění nahrazení sekvence kódující SPM sekvencí kódující SPM_{IV} provedené v proteinu FrpC. Odpovídající části sekvence obou proteinů jsou pro názornost vyobrazeny shodným způsobem. Bloky v C-koncových oblastech proteinů představují RTX doménu a zcela na konci obou proteinů je znázorněn sekreční signál. Čísla pod obrázky označují rozsah jednotlivých částí v příslušné molekule proteinu.

Proteiny FrpC-His a FrpC(SPM_{IV})-His byly produkovány v buňkách *E. coli* BL21/λDE3 (kanamycin 60 mg/ml, indukce IPTG, 30 °C) (kap. 5.11.8.1) a purifikovány na Ni-NTA agarose, způsobem popsaným v kap. 5.11.9.2. Jejich schopnost štěpit se v přítomnosti 10 mM Ca²⁺ a 10 mM cysteinu byla ověřena postupem popsaným v předchozích kapitolách. Po elektroforetickém rozdělení fragmentů obou proteinů po štěpení

a vizualizaci Coomassie Blue, byla provedena densitometrická analýza a na základě získaných údajů byl vytvořen graf kinetiky štěpení obou uvedených proteinů (Obr. 26).



Obr. 26: **Porovnání kinetiky vápníkem indukovaného štěpení FrpC(SPM_{IV})-His a původního FrpC-His.** Data získaná po densitometrické analýze produktů štěpení jednotlivých proteinů byla statisticky vyhodnocena a kinetiky štěpení obou proteinů byly vyneseny do grafu. Každý bod grafu byl získán ze čtyř různých stanovení a je prezentován jako průměrná hodnota \pm standardní odchylka.

Z obrázku 26 je patrné, že hybridní protein FrpC(SPM_{IV})-His se účinně štěpí v přítomnosti 10 mM Ca²⁺ a 10 mM cysteinu. Vzhledem k zachování funkce a vysokému stupni sekvenční homologie je zřejmé, že konzervované části obou sekvencí nesou informaci potřebnou pro schopnost obou proteinů se štěpit.

Následující kapitoly dokumentují výsledky získané při identifikaci a charakterizaci takových úseků v SPM proteinu FrpC.

6.1.1.3 Strukturní analýza SPM₁₇₇ pomocí metod nukleární magnetické rezonance a mutagenese aspartátového zbytku v pozici 165 SPM₁₇₇

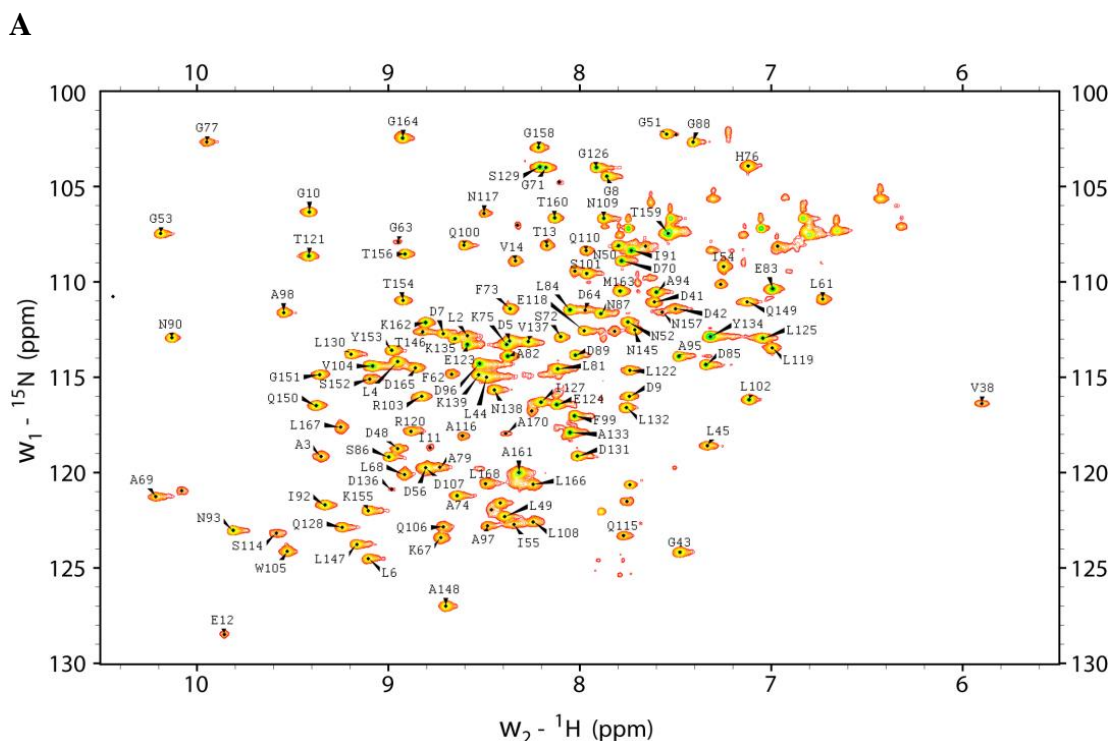
6.1.1.3.1 Vyhledání konzervovaných částí sekvence SPM různých bakteriálních druhů – porovnání se sekvencí SPM₁₇₇

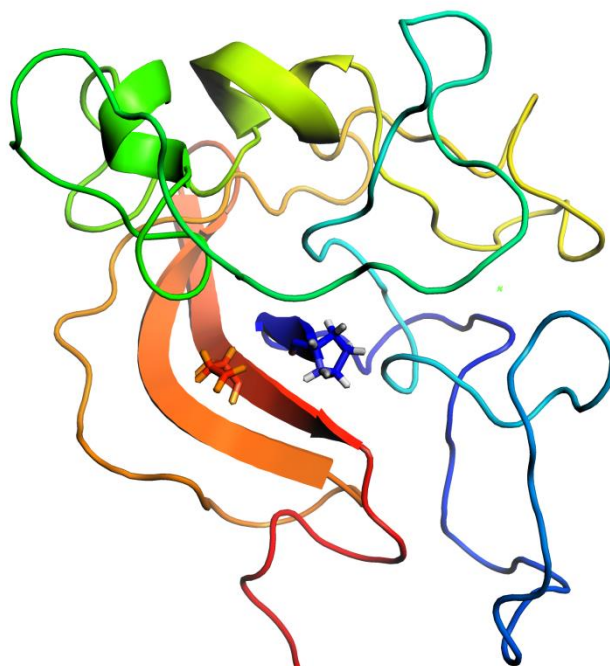
Pro nalezení částí sekvence SPM₁₇₇ (poslední dlouhodobě stabilní část sekvence SPM₂₄₄) majících zásadní katalytický a strukturní význam pro autokatalytickou aktivitu SPM proteinu FrpC, bylo v dostupných proteinových databázích provedeno vyhledání proteinových sekvencí vykazujících alespoň 70% podobnost s primární sekvencí SPM. Z Obr. 27 je patrné, že podobné typy primárních proteinových sekvencí se objevují napříč rozmanitým spektrem bakteriálních rodů s velmi odlišnou životní nikou (patogenní vs. nepatogenní typy bakterií, oceánské extremofilní bakterie, bakterie říčních sedimentů apod.). Funkce těchto proteinů zůstává ve většině případů neznámá. Mezi těmi, jejichž funkce popsána byla, se jedná opět o funkčně velmi heterogenní skupinu (bakteriociny – *Nitrococcus mobilis*, *Xylella fastidiosa*; proteiny s podobností Ca²⁺-vázájícím hemolysinům – *Methylobacter* sp., *Xylella fastidiosa*, *Ralstonia solanacearum*; adhesiny vnější membrány – *Geobacter* sp., proteiny podobné RTX toxinům (*Hahella chejuensis*, *Shewanella* sp.) a RTX protein ApxIVA A. *pleuropneumoniae*.

SPM ₁₇₇	DPLALDLGGGIEIVATKGFSGSLFDHNRD	-----	QDLNQDGISQANEL-RTLEELGIQSLD-LAYKDYNKNLGNNGNTLAQGGSYTKTNGTTAKMG-----	LLLAADNLHSRFK--
Leptothrix	DPLVLDLNGDGVQTAAADG--VFDFINAT	-----	VDADSDGLADLGEEL-RTLADLGIQSLD-LGAQLGTLD-NGNLLGLTSSYQADGSSHQMA-----	IV-----
Photorhabdus	DPLVLDLNGDGVQTVSELG--VIFDFDGG	-----	QDRNLGLSTPDEL-NSLEETDIKSIQ-LNYQESDYFDLQGNHYGLTSTVWMSNGYQTEIT-----	VWFKQEP--
Pseudomonas	DPLVLDLNGDGVSTTSVSSG--AHFDHNVAD	-----	IDSNNGISEASEI-HKLYDVGVASIN-VQYKVSNNLDAGGNDHRLGQSYTKVDSVLAD-----	VWFATNFVDSVEK--
Cyanobacterium	DPLVLDLNGDGVSTTAPDPAAGSLAFDLNAD	-----	QDSNGDAISQAEL-STLDAHQITSL-SLYTTTESSDNGNLIRETSSYTSADGSTALLA-----	VWFATTTSGSEN--
Geobacter	DPLVLDLNGDGVETVIGISR--VDFDHNRD	-----	RDLNQDGNSQAEL-TTLDAGVAYID-LAAVNRN-VWQNGNTIAASESTLTKEDGSTATIA-----	VNLANNPADSRFV--
Abiotrophia	DPLALDLGGGIEITDVKNQ--TYFDLNS	-----	RDLNQDGSSSEEL-FSLDELGIKALN-LANNVNSTDANGNII SRVGSYEKT DGS GTMG-----	YLL-----
Hahella	DPLVLDLNGDGVETVADGS--VDFDHNGD	-----	RDLNQDGESQVNEL-FKLSDLGITAI G-TSHKEGTINVGNQNSIAQGGFTKSDGTGETGA-----	AEINLSSMNFYREFT--
Xylella	DPLVLDLNGDGVETVAAGKN--ILFDHNGD	-----	RDLNQDGHSQANEL-FTLSNLGITASI TLPTDTQRVNLGNNGNMDARGSYTRTDGRSGTVG-----	QLQGVQDQFYRGRGAH
Ralstonia	DPLVLDLNGDGVETTTTTRDGA VILFDHNGD	-----	RDLNQDGISQANEL-TTLSANNI VSI G-TNSAAVRTDLGNNGVQTAAGTFSRSGTGTGETNGAAADL	LLVNTFYRQFT--
Pseudomonas	DPLALDLGGGIEIVSSNSG--ITFDHNGD	-----	QDLNQDGIAEANEL-KSLDGHNITAIN-LDIEKS-TEDNNGNLI SAIGSYSRDGT SGLVNGNQSLAG	LDLASNPFYREYT--
Shewanella	DPLVFDLNGDGVETVSSDAG--ILFDHNGD	-----	QDANQDGISQASEM-KTSELDIASIN-LNDAEYVNIQEDNLI SFTSEYTDSEGNHSGF-----	LDFAVNGFHREF--
Methylobacter	DPLTFDLNGDGVETVGISSNTILFDHNGD	-----	RDLNQDGVSQSEL-FTLNQLGIVGIN-VASTEHTT LSNQNLADTGSIKSDGSGTGLGEVTGNMG	INLADSTFHREFA--
Sideroxydans	DPLVLDLNGDGVETVPLTNP--PIFDHNGD	-----	QDLNQDGISQANELRYLADLNTSIN-VAATQHSQMLASGNQMDLGSFTYADGSGTATGSVS-NMA	INLADTFHRTFV--
Neisseria	DPLVLDLNGDGVETVSHNGYKALFDHNGD	-----	RDLNQDGVSQKEEL-FTLEEVGVQSLN-VAYQDTNQNLGNNGNRLAQEGSYTGKDNVRKMG-----	LLFGNNTLYSRYS--
Acinetobacter	DPLVLDLNGDGVETIAANKWAGVLFHND	-----	RDLNQDGVSQTNEL-FGLTELGIQSLN-LNHTNTDTALGNNDILAQGTGFETLDGQSHMG-----	VNFSGNFYSSFN--
Actinobacillus	DPLALDLGGGIEIVSMNGRQALFDHNGD	-----	RDLNQGFSEANEL-FSLESNLKSLH-TAYEERNDFLAGNLI AQLGKYEKT DGTFAQMG-----	VNFSGNFYSRFT--
Nitrococcus	DPLAVDLNGDGVETVGTNGLAGVFDQND	-----	QEANGDGVQAGEL-HSLEEMGISALN-LAHSQTDQSLTGNNILIQGTGFVRSDDTKGLG-----	VDFAEHDFHRRFE--
Gallionella	DPLVLDLNGDGVETVAASGSSGAMFDQNGD	-----	RDLNQDGISEAGEL-FSLGDTGIQSFN-TAVSNTASTVAGGTAETGSYTRTDGT VSTMA-----	VNFTQDTFHSSYT--
Sulfurospirillum	DPLVLDLNGDGVETVSTFIKT--QTFDMNGD	-----	MDTNSDGISTDEL-KTLQELNITSIN--LNAKETSTSEAYNTISETSTFTQ-NGQTKTIN-----	IV-----

Obr. 27: Srovnání aminokyselinových sekvencí proteinů z různých bakteriálních rodů vykazujících více než 70 % podobnost se sekvencí SPM₁₇₇ proteinu FrpC bakterie *N. meningitidis*. Zelenožlutě jsou vyznačeny aminokyselinové zbytky N-terminálního vysoce konzervovaného oktapeptidu, následovány dalším konzervovaným hexapeptidem. Kritická se zdá být zejména pozice Asp₁, Pro₂, Asp₆ a Leu₈ jednotlivých SPM-podobných sekvencí, kde se obecně nevyskytují záměny za jiné aminokyselinové zbytky. V případě zbytků přítomných v hexapeptidu se jedná výhradně o isopolární aminokyselinové záměny. Přerušovaná čára představuje vynechané části sekvence pro lepší názornost. Červeně je zvýrazněna pozice Asp₁₆₅, posledního konzervovaného zbytku v blízkosti Ala₁₆₉ (C-koncový zbytek nejkratšího funkčního SPM). Pomocí NMR (kap. 5.11.14) bylo ukázáno (viz dále kap. 6.1.1.3.2), že oblast sekvence a zejména pak Asp₁₆₅ se nachází v bezprostřední blízkosti Asp₁, Pro₂ a je tedy možné, že dochází k jejich vzájemné interakci, se zásadním významem pro autokatalytické štěpení proteinu FrpC.

Další záměna byla provedena na červeně znázorněném aspartátovém zbytku v pozici 165 SPM₁₇₇. Ten je opět výrazně konzervovaný napříč všemi bakteriálními druhy. V této pozici se kromě aspartátového zbytku výlučně vyskytují asparaginové a glutamátové zbytky. Pouze v jednom případě jde o zbytek tyrosinu a v jednom případě o zbytek serinu. Pomocí NMR (P. Macek, osobní sdělení) bylo též ukázáno, že je to právě Asp₁₆₅, který se nachází v bezprostřední blízkosti Asp₁ a Pro₂ proteinu SPM₁₇₇, a je tedy možné, že dochází k jejich vzájemné interakci mající vliv na autokatalytické štěpení proteinu FrpC (Obr. 28, výpočet strukturních dat provedl P. Macek, nepublikováno).



B

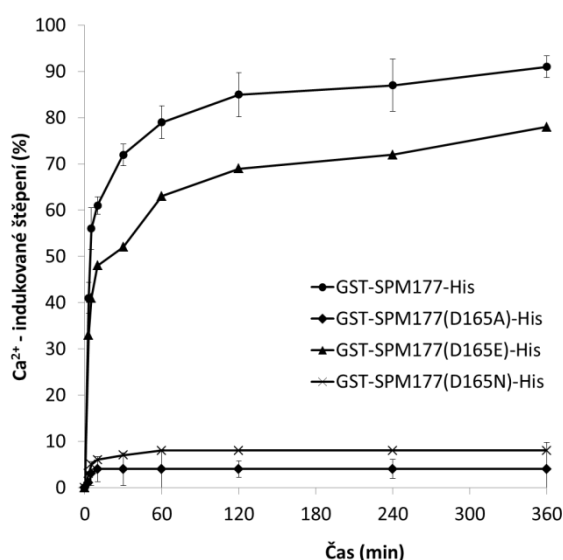
Obr. 28: **Strukturní analýza SPM₁₇₇ pomocí NMR spektroskopie.** (A) ¹H-¹⁵N HSQC spektrum SPM₁₇₇. Vyznačeny jsou píky jednotlivých aminokyselinových zbytků SPM₁₇₇. Pro přehlednost bylo upuštěno od znázornění postranních řetězců zbytků glutaminu, asparaginu a argininu. V průběhu analýzy a díky velmi dobrému rozložení píků v uvedeném spektru bylo zjištěno, že dochází k vytvoření terciární struktury proteinu SPM₁₇₇. Provedené výpočty ukázaly blízkost konzervovaného zbytku prolinu v pozici 2 a zbytku aspartátu v pozici 165. (B) Stuhlý model předběžné struktury SPM₁₇₇. Modře je vyznačena N-koncová oblast proteinu se zbytkem prolinu v pozici 2. Červená barva představuje C-koncovou část proteinu s aspartátovým zbytkem v pozici 165.

6.1.1.3.2 Štěpení SPM₁₇₇-His a SPM₁₇₇-His proteinů nesoucích substituce Asp₁₆₅ a ¹H NMR studie proteinu SPM₁₇₇-His

Pro studium role aspartátového zbytku v pozici 165 SPM₁₇₇ v aktivitě SPM byla připravena sada fúzních proteinů nesoucích GST, His a sekvence SPM₁₇₇ nesoucí bodové mutace výměnou zbytku aspartátu 165 za zbytek alaninu, glutamátu nebo asparaginu (SPM₁₇₇_D165A, E, N) (kap. 5.7, 5.9, 5.11.3, 5.11.6.4, 5.11.6.6, 5.11.6.7 a 5.11.8.1) - tyto aminokyselinové zbytky se totiž vyskytují v této pozici i v jiných SPM-podobných sekvencích – viz Obr. 27.

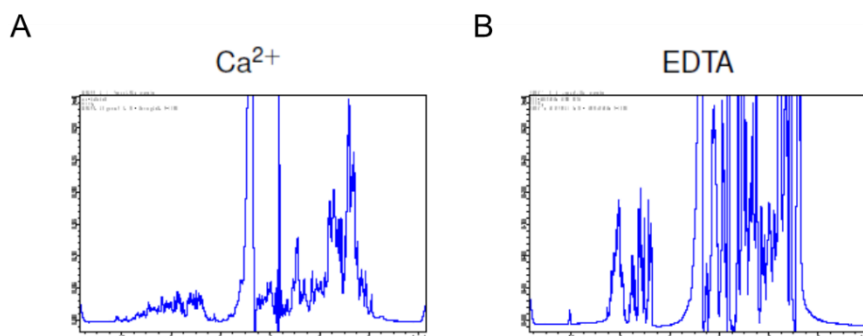
Všechny připravené mutantní fúzní proteiny (GST-SPM₁₇₇-His, GST-SPM₁₇₇(D165A, E, N)-His) byly produkovány v buňkách *E. coli* BL21/λDE3 způsobem popsáným v kap. 5.11.8.1, purifikovány z cytosolické buněčné frakce na koloně Ni-NTA agarosy (kap. 5.11.9.2), a následně pak byla ověřena jejich štěpící aktivita v přítomnosti redukčního činidla

(10 mM cystein) v roztoku přidavkem CaCl_2 do finální koncentrace 10 mM. Jak je patrné z Obr. 29, k účinnému štěpení fúzního proteinu dochází pouze u mutanty GST-SPM₁₇₇(D165E)-His. Je tedy pravděpodobné, že přítomnost aspartátového nebo glutamátového zbytku v pozici 165 SPM je nezbytná pro zachování autokatalytické aktivity proteinu FrpC.



Obr. 29: Porovnání kinetiky vápníkem-indukovaného štěpení GST-SPM₁₇₇(D165A, E, N)-His a původního GST-SPM₁₇₇-His. Data získaná po densitometrické analýze produktů štěpení jednotlivých proteinů byla statisticky vyhodnocena a kinetiky štěpení všech proteinů byly vyneseny do grafu. Každý bod grafu byl získán ze čtyř různých stanovení a je prezentován jako průměrná hodnota \pm standardní odchylka.

V případě purifikovaného proteinu SPM₁₇₇-His byly provedeny též paralelní NMR studie s isotopově značenými proteiny (kap. 5.11.14). Nejprve byla provedena měření a analýsy ve spektru ^1H , následně pak též ve spektru ^{13}C . Z výsledků analýsy ^1H spekter je patrné, že v přítomnosti vápenatých iontů dochází ke skládání struktury proteinu SPM₁₇₇-His, zatímco v jejich nepřítomnosti je protein zcela nestrukturovaný a zaujímá konformaci náhodného klubka (Obr. 30). Všechny výsledky provedených analýs a výpočtů poukazují na skutečnost, že sekvence SPM₁₇₇-His v oblasti kolem Asp₄₁₄ (tedy prvního aminokyselinového zbytku analysované sekvence SPM₁₇₇-His) a Asp₁₆₅ (tedy aminokyselinového zbytku v pozici 165 sekvence SPM₁₇₇-His) se opravdu nacházejí v těsné blízkosti. Je tedy vysoce pravděpodobné, že právě v těchto oblastech sekvence proteinu dochází v přítomnosti vápenatých iontů k tvorbě samotného katalytického jádra aktivního místa SPM.



Obr. 30: ^1H NMR analýza purifikovaného SPM₁₇₇-His proteinu. (A) ^1H spektrum SPM₁₇₇-His v přítomnosti 1 mM Ca^{2+} . (B) ^1H spektrum SPM₁₇₇-His v přítomnosti 1 mM EDTA.

Jak bylo ukázáno pomocí NMR studie (P. Macek, osobní sdělení) nemutovaného SPM₁₇₇-His, nachází se aminokyselinový zbytek v pozici 165 SPM v bezprostřední blízkosti aminokyselinových zbytků v pozicích 1 až 8, a zejména pak v těsné blízkosti Asp₁ a Pro₂ SPM₁₇₇. Proto jsme se rozhodli analyzovat strukturu N-terminálního oktapeptidu SPM₁₇₇-His pomocí bodové mutagenézy.

6.1.1.4 Mutagenéza aminokyselinových zbytků N-terminálního oktapeptidu SPM proteinu FrpC

Pro analýzu významu aminokyselinových zbytků v N-koncové části SPM₁₇₇ pro jeho štěpící vlastnosti byla připravena sada fúzních proteinů GST-SPM₁₇₇-His nesoucích jednotlivé a dvojité záměny aminokyselinových zbytků v jeho N-terminálním oktapeptidu (viz Obr. 27). Všechny mutace byly navrženy tak, aby výsledné aminokyselinové složení oktapeptidu odpovídalo některé z přirozeně se vyskytujících N-terminálních sekvencí SPM-podobných proteinů z jiných bakteriálních druhů. Tab. 8 uvádí jednotlivé aminokyselinové záměny a jejich pozice v rámci zmíněného oktapeptidu.

Tab. 8: Aminokyselinové složení N-koncového oktapeptidu SPM a SPM-podobných sekvencí u různých bakteriálních druhů.

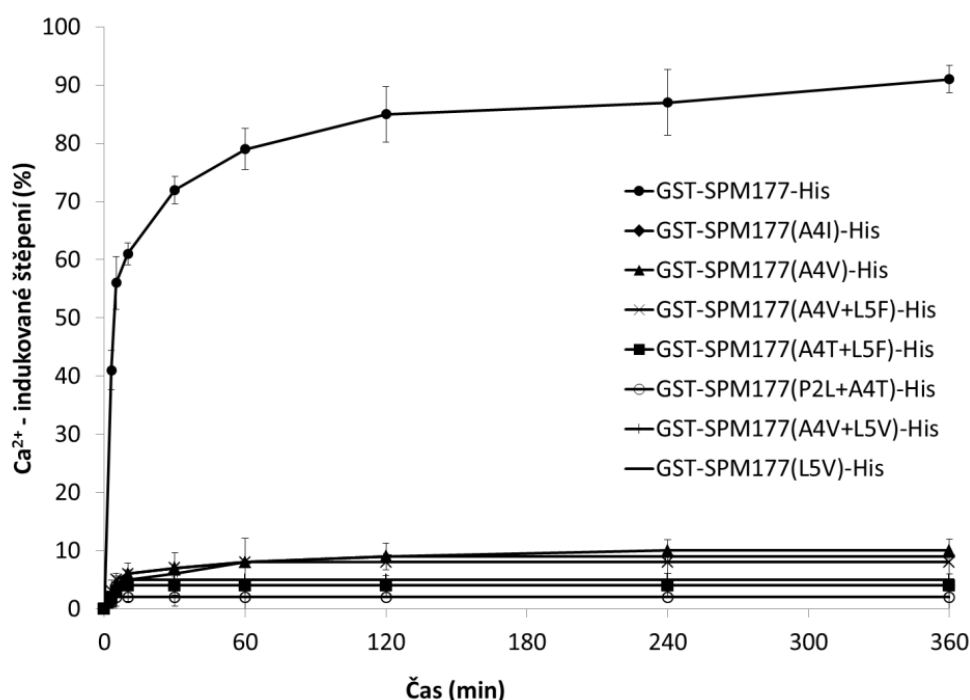
Bakterie	Aminokyselinové složení sekvence oktapeptidu
<i>Neisseria meningitidis</i>	D ₁ PLALDLD ₈
<i>Hahella chejuhensis</i>	D ₁ PLILDLD ₈
<i>Xylella fastidiosa</i>	D ₁ LPVLDLD ₈
<i>Shewanella sp.</i>	D ₁ PLVFDLD ₈
<i>Methylobacter sp.</i>	D ₁ PLTFDLD ₈
<i>Francisella tularensis</i>	D ₁ LLTLDLD ₈
<i>Geobacter sp.</i>	D ₁ PLVVDLD ₈
<i>Nitrococcus mobilis</i>	D ₁ PLAVDLD ₈

Záměny ve srovnání s aminokyselinovým složením sekvence oktapeptidu SPM *Neisseria meningitidis* jsou vyznačeny tučným podtrženým písmem.

6.1.1.4.1 Štěpení SPM variant nesoucích mutace N-terminálního oktapeptidu SPM proteinu

FrpC

Všechny připravené mutantní fúzní proteiny (GST-SPM₁₇₇_A4I-His, GST-SPM₁₇₇_A4V-His, GST-SPM₁₇₇_A4V+L5F-His, GST-SPM₁₇₇_A4T+L5F-His, GST-SPM₁₇₇_P2L+A4T-His, GST-SPM₁₇₇_A4V+L5V-His, GST-SPM₁₇₇_L5V-His) byly produkovány v buňkách *E. coli* BL21/λDE3 způsobem popsáným v kap. 5.11.8.1 a purifikovány z cytosolické buněčné frakce na koloně Ni-NTA agarosy (kap. 5.11.9.2). Následně byla ověřena jejich štěpící aktivita v přítomnosti redukčního činidla (10 mM cystein) v roztoku přidavkem CaCl₂ do finální koncentrace 10 mM. Jak je patrné z obr. 31, k účinnému štěpení žádného z uvedených mutantních fúzních proteinů nedocházelo. Je tedy pravděpodobné, že pro zachování autokatalytické aktivity celého proteinu FrpC je nezbytná přítomnost všech zaměněných aminokyselinových zbytků N-koncového oktapeptidu SPM. To naznačuje, že tento oktapeptid tvoří konzervovanou funkční strukturu rozeznávanou aktivním centrem štěpícího modulu.



Obr. 31: Porovnání kinetiky vápníkem-indukovaného štěpení fúzních proteinů nesoucích aminokyselinové záměny v N-koncovém oktapeptidu SPM₁₇₇ a původního GST-SPM₁₇₇-His. Data získaná po densitometrické analýze produktů štěpení jednotlivých proteinů byla statisticky vyhodnocena a kinetiky štěpení všech proteinů byly vyneseny do grafu. Každý bod grafu byl získán ze čtyř různých stanovení a je prezentován jako průměrná hodnota \pm standardní odchylka.

6.2 Příprava a vakcinační využití rekombinantních antigenů bakterie *A. pleuropneumoniae*

6.2.1 PŘÍPRAVA VYBRANÝCH REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ *A. PLEUROPNEUMONIAE*

Žádný z doposud testovaných antigenů *A. pleuropneumoniae* nebyl sám o sobě jako jediná složka vakcíny schopen navodit kompletní ochranu před projevy infekce. Složení komerčních vakcín proti aktinobacilové pleuropneumonii je založeno na kombinaci několika různých antigenů (Chiers, 1998; Haga, 1997; Van Overbeke, 2001; Rossi-Campos, 1992). Tyto vakcíny jsou v různé míře účinné proti rozvoji akutního onemocnění, nicméně jimi navozená imunita nedokáže zabránit bakterii v kolonizaci hostitele a nevykazuje též dostatečnou zkříženou protektivitu proti jednotlivým sérotypům (Chiers, 1998). Proto pokračuje vývoj vakcíny nové generace, založené zejména na použití různých proteinů vnější membrány *A. pleuropneumoniae* a/nebo sekretovaných antigenů (Oldfield, 2008). Mezi potenciálně účinné antigeny by díky svým vlastnostem a lokalizaci v buňce *A. pleuropneumoniae* mohl patřit i podjednotkový protein ApfA, který je strukturním proteinem fimbrií typu IV (3.5.2.2) (Zhang, 2000). Fimbrie hrají obecně velmi důležitou roli ve virulenci

různých gramnegativních bakterií {Luke, 2004, 15501752; Bieber, 1998, 9641917; Luke et al., 2004; Bieber et al., 1998; Koga, 1993, 7681046; Wall, 1999, 10216854; Craig, 2004, 15100690; Hansen, 2006, 16983195}. V případě ApfA se jedná o vysoce konzervovaný protein napříč jednotlivými sérotypy *A. pleuropneumoniae*. K jeho expresi dochází výhradně *in vivo* (Boekema, 2004b). Možná role ApfA v adherenci a kolonizaci, činí tento protein vhodným kandidátem pro vývoj zcela nové vakcíny proti aktinobacilové pleuropneumonii.

Následující kapitoly jsou věnovány přípravě a testování experimentální podjednotkové vakcíny proti prasečí pleuropneumonii.

6.2.1.1 Příprava rekombinantních antigenů *rApxI-IVA*, *rTbpB* a *rApfA*

Pro účely přípravy vakcíny proti prasečí pleuropneumonii bylo připraveno celkem šest rekombinantních proteinů *A. pleuropneumoniae*, a to *rApxIA*, *rApxIIA*, *rApxIIIA*, *rApxIVA*, *rTbpB*, *rApfA*. Geny pro všechny uvedené antigeny byly nejprve amplifikovány metodou PCR z genomové DNA příslušného předem zvoleného sérotypu *A. pleuropneumoniae* (kap. 5.10 a kap. 5.11.6.5). Sérotypy použité pro amplifikaci a následnou izolaci jednotlivých genů jsou uvedeny v Tab. 9.

Tab. 9: **PCR amplifikace genů pro jednotlivé antigeny** – původ, dvojice použitých PCR primerů a délka amplifikovaného úseku DNA.

Gen ¹	Serotyp <i>A. pleuropneumoniae</i>	Dvojice použitých PCR primerů (5'→3') ²	Délka amplifikované sekvence DNA (počet bazických párů)	Molekulová hmotnost proteinu ³ (kDa)
<i>apfA</i>	7	CCGTCGACATGTCATATAACAGTTATAC CCGCGGCCGCATTTGATGCGCAGAAATTT	342	14
<i>apxIA</i>	1	GGGTCGACACGCTAACTCTCAGCTCGATA GGGCGGCCGCAGCTGCTTGTGCTAAAGAA	3069	113
<i>apxIIA</i>	7	CCGTCGACACTCAAAATCACTTTGTCATCA CCGCGGCCGCAGCGGCTCTAGCTAATTG	2871	105
<i>apxIIIA</i>	2	GGGTCGACACAGTACTTGGTCAAGCATGTT GGGCGGCCGCAGCTGCTCTAGCTAGGTTA	3159	115
<i>apxIVA</i>	3	CCGTCGACACACAAAATTAATCTATGCAAGA CCGCGGCCGCTAAAGCAGCTGTTAAGCTATT	5418	205
<i>tbpB</i>	7	CCGTCGACACTCTGGCGGAAAAGGAAGTT CCGCGGCCGCTTTTTTACTTGTGTTTTCGA	1644	60

¹Sekvence jednotlivých genů byly získány z GeneBank pod následujícími referenčními čísly (*apfA*, AY235719.1; *apxIA*, AF240779; *apxIIA*, CP001091; *apxIIIA*, L12145; *apxIVA* AF030511; *tbpB*, U16017).

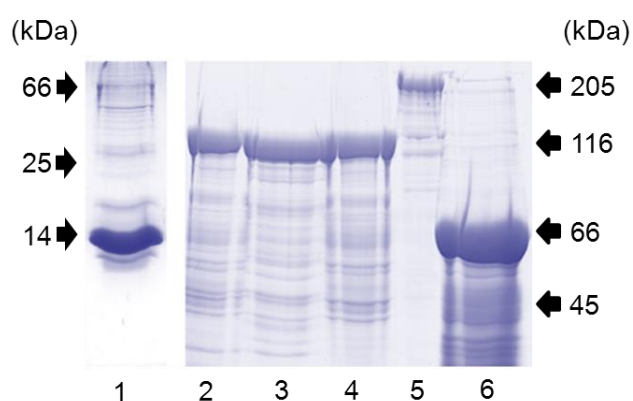
²Všechny použité oligonukleotidy byly připraveny a dodány firmou Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika. Oligonukleotid uvedený v každé buňce v pořadí jako první reprezentuje tzv. forward PCR primer, druhý v pořadí pak tzv. reverse PCR primer. Zásahová místa pro použité restriční endonukleasy jsou vyznačena tučným písmem a podtržením.

³Relativní molekulová hmotnost jednotlivých proteinů byla vypočtena s užitím programu „Compute pI/Mw tool (ExPASy)“.

Produkce požadovaných proteinů byla provedena v buňkách *E. coli* BL21(λDE3) produkujících T7 RNA polymerasu k umožnění exprese z vektoru pET28b (kap.5.11.8.1). Příslušné antigeny byly získány z močovinných extraktů (kap.5.11.8.2 a kap. 5.11.8.4) purifikací na Ni-NTA agarose (kap. 5.11.9.2). Všechny získané eluční frakce byly převedeny do pufru o shodném složení (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 300 mM NaCl; 8 M močovina) gelovou permeační chromatografií na matrici Sephadex G-25 (5.11.9.4). Dosažená výtěžnost po všech provedených purifikačních krocích byla: 40 mg rApxIA, rApxIIA a rApxIIIA, resp., 15 mg rApxIVA a 50 mg rTbpB na jeden litr bakteriální kultury. Homogenita požadovaných proteinů byla zjištěna elektroforézou elučních frakcí v polyakrylamidovém gelu (kap. 5.11.10) (Obr. 32). Identifikace proteinů pak byla provedena metodou Western blot s použitím anti-His monoklonální protilátky značené křenovou peroxidasou v ředění 1:5000 (kap. 5.11.11). U všech Apx proteinů byla též stanovena hemolytická aktivita (kap.5.11.13 a 5.11.13.1). Bylo ukázáno, že i tyto neacylované verze rApxIA-IIIA jsou schopny lyzovat beraní červené krvinky. Největší hemolytickou aktivitu vykazoval rApxIA. Rekombinantní ApxIVA beraní červené krvinky nelyzoval (data nejsou ukázána).

V případě proteinu rApfA bylo postupováno do jisté míry odlišným způsobem nežli u rApxI-IVA a rTbpB. Přímá produkce celistvého rApfA v buňkách *E. coli* BL21(λDE3) nebyla možná, protože protein byl pro buňky *E. coli* příliš toxický. Do hodiny po indukci exprese proteinu rApfA docházelo k masivní lysi buněk *E. coli* a výtěžnost takové kultivace byla prakticky nulová. Aby se předešlo toxicitě rApfA, byla na úrovni DNA odstraněna sekvence kódující N-terminálních 30 aminokyselinových zbytků vysoce hydrofobní části proteinu. Po odstranění této sekvence se výtěžnost kultivace oproti produkci celistvého proteinu výrazně zvýšila a k lysi buněk *E. coli* již nedocházelo.

Pro izolaci a purifikaci rApfA byl pak použit stejný postup jako v případě ostatních antigenů (viz výše). Výtěžnost po všech provedených purifikačních krocích byla v případě rApfA 5 mg na litr bakteriální kultury. Homogenita proteinu byla zjištěna elektroforézou eluovaných frakcí v polyakrylamidovém gelu (kap. 5.11.10) (Obr. 32). Identifikace proteinu pak byla provedena metodou Western blot s použitím anti-His monoklonální protilátky značené křenovou peroxidasou v ředění 1:5000 (kap. 5.11.11).

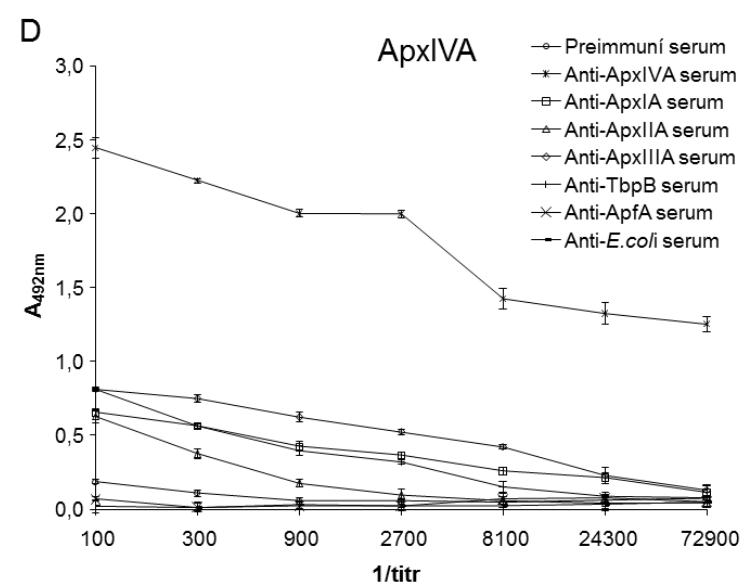
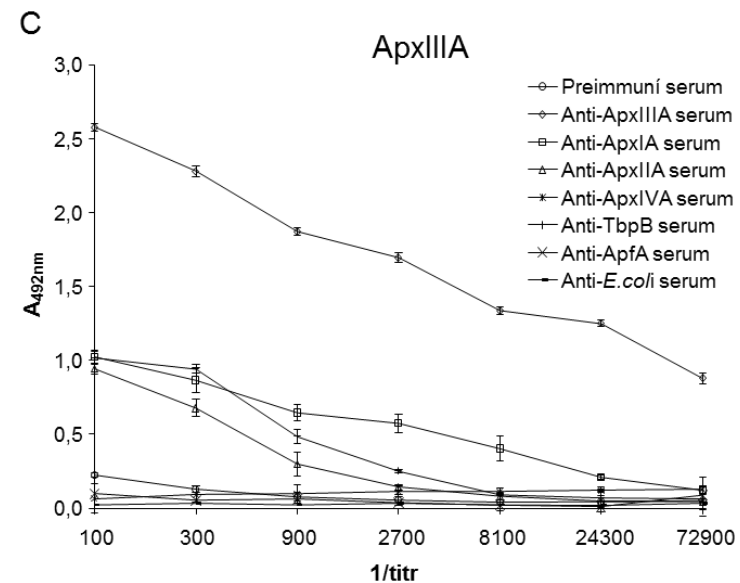
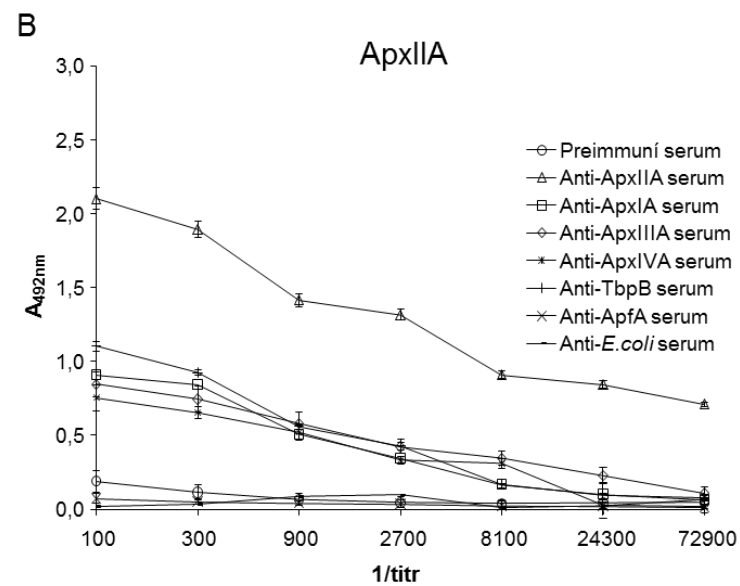
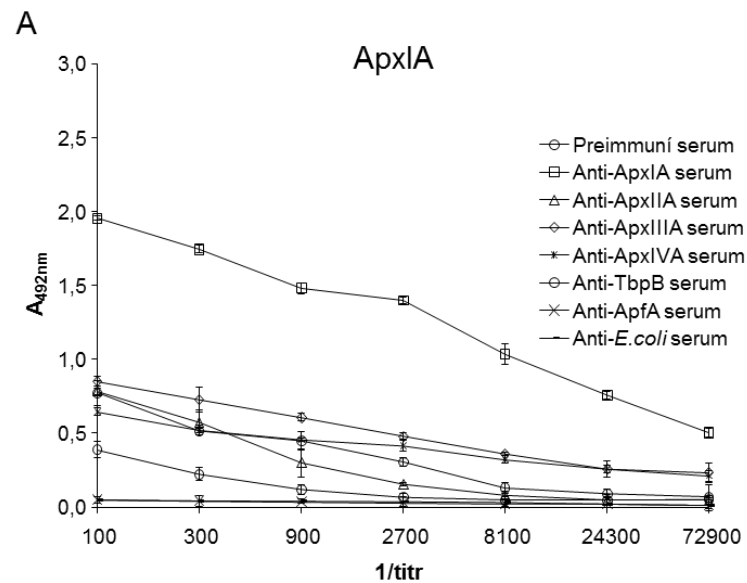
Obr. 32: **Purifikované rekombinantní proteiny rApfA, rApxI-IVA a rTbpB.** Jednotlivé

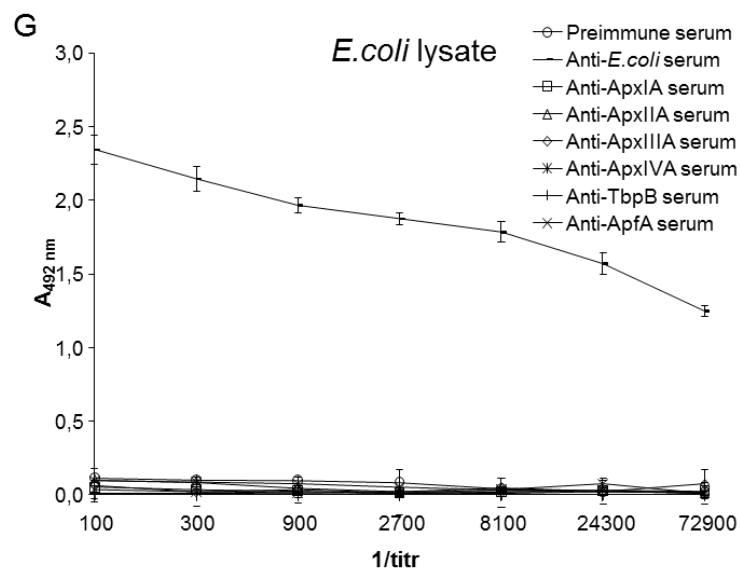
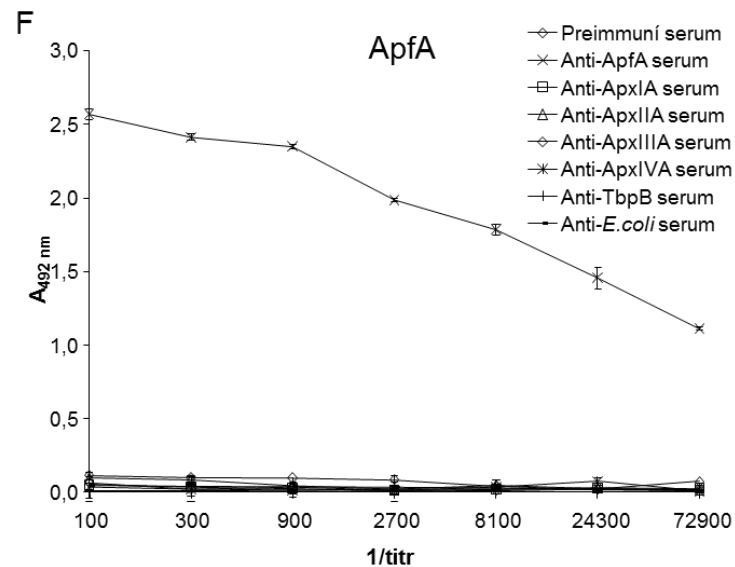
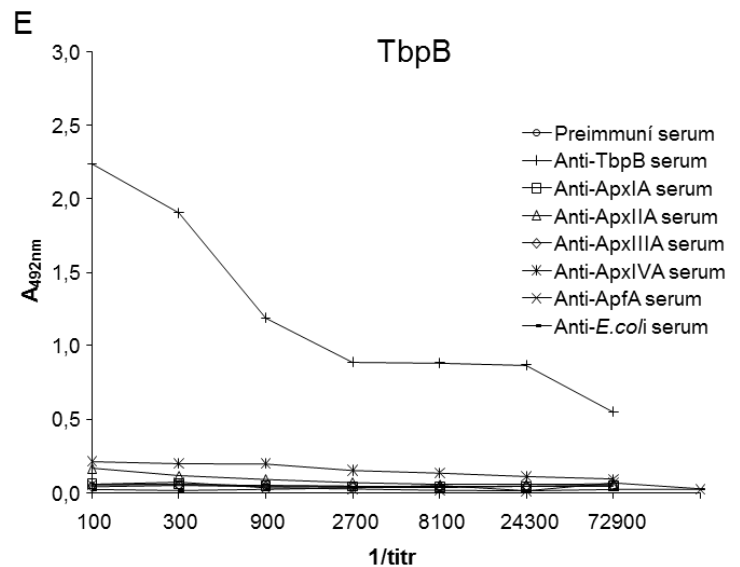
rekombinantní proteiny byly purifikovány na Ni-NTA agarose a následně vizualizovány pomocí elektroforesy v 15% (rApfA, vzorek č. 1), resp. 7,5% polyakrylamidovém gelu (v řadě za sebou vzorky č. 2-6, rApxI-IVA a rTbpB) po barvení Coomassie Blue.

6.2.2 PŘÍPRAVA A TITRACE HYPERIMUNNÍCH MYŠÍCH SÉR

Pro přípravu specifických hyperimunních sér byly použity ICR outbrední myši (kap. 5.11.17.1).

Pro ELISA detekci připravených rekombinantních proteinů byla připravena sada hyperimunních myších sér: anti-rApfA, anti-rApxIA, anti-rApxIIA, anti-rApxIIIA, anti-rApxIVA a anti-rTbpB (kap. 5.11.17.2). Specifita všech hyperimunních sér byla následně testována metodou ELISA pro vyloučení možných křížových reakcí s dalšími rekombinantními proteiny *A. pleuropneumoniae* (rApfA, rApxIA, rApxIIA, rApxIIIA, rApxIVA a rTbpB) a kontaminujícími proteiny *E. coli* (Obr. 32).





Obr. 32: Titry specifických protilátek proti jednotlivým antigenům v myších hyperimunních sérech. Panely zobrazují výsledky titrace sér pro jednotlivé antigeny. Každý bod grafu byl získán jako průměrná hodnota ze stanovení hladin příslušných protilátek v sérech čtyř myší imunizovaných daným antigenem \pm standardní odchylka.

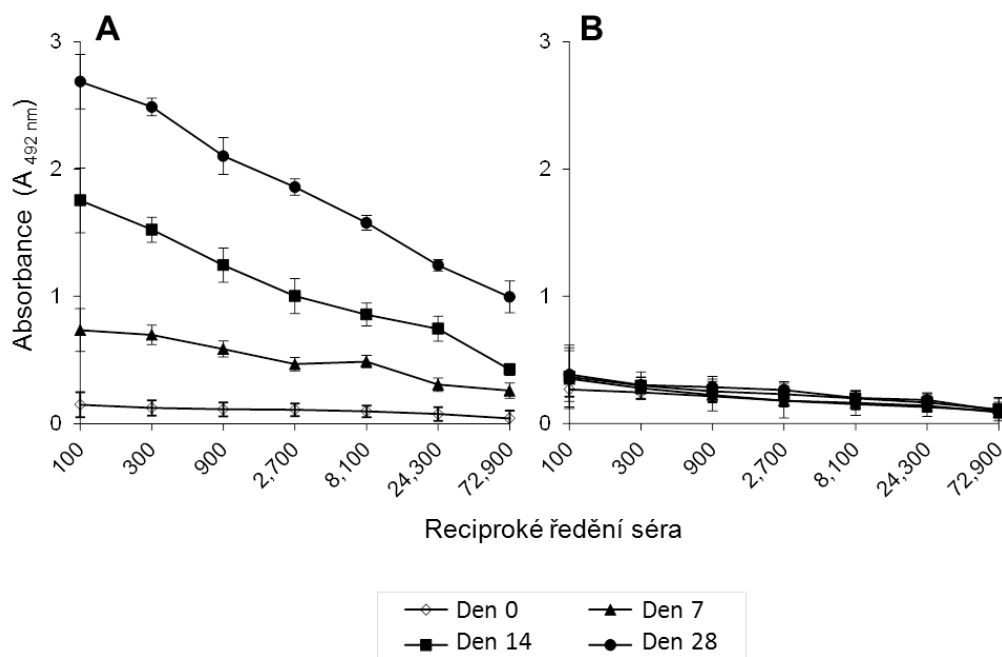
6.2.2.1 Optimalizace ELISA pro stanovení rApx proteinů

Vzhledem k poměrně značnému stupni sekvenční homologie (až 60%) vykazují v sérologických stanoveních jednotlivé ApxI-IIIa proteiny četné křížové reakce (Obr. 32A-C). Za účelem jejich potlačení a dosažení maximální možné specifity dané ELISA metody pro daný antigen (kap. 5.11.16) byly postupně testovány různé koncentrace jednotlivých antigenů použitých k potažení ELISA destičky. Koncentrace, při kterých již nedochází k významným křížovým reakcím mezi jednotlivými proteiny, přičemž citlivost metody je nejvyšší, byly následující: 63 ng/ml (rApxIA), 63 ng/ml (rApxIIa) a 32 ng/ml (rApxIIIa) (data nejsou uvedena).

6.2.3 TESTOVÁNÍ ÚČINNOSTI EXPERIMENTÁLNÍ VAKCÍNY PROTI PRASEČÍ PLEUROPNEUMonii

6.2.3.1 Imunizace prasat a sledování tvorby protilátek proti jednotlivým antigenům pro optimalizaci vakcinačního schématu

Pro pilotní imunizace byly skupiny po pěti prasatech imunizovány jednotlivými antigeny v množství 50 µg na dávku (v případě rApfA 100 µg). Příslušná vakcína byla aplikována ve dvou jednotlivých dávkách v olejovém adjuvans intramuskulárně ve dvoutýdenních intervalech (kap. 5.11.18.3). Na Obr. 33 je jako příklad dokumentován nárůst hladin protilátek po vakcinaci rApfA a jejich další nárůst po revakcinaci ve srovnání s hladinami přítomnými v preimunních sérech. Aplikace třetí dávky neměla již na další nárůst hladin protilátek významný vliv, a byla tedy z budoucího ekonomického hlediska shledána nadbytečnou (data nejsou uvedena). Pro kontrolu je též dokumentována nepřítomnost protilátek proti proteinům lyzátu *E. coli*. Jednotlivé křivky uvedené na Obr. 33 (panel A i B) reprezentují průměr dat získaných analýsou každého z pěti odebraných sér.



Obr. 33: **Pilotní imunizace prasat antigenem rApfA.** Skupina pěti prasat byla intramuskulárně imunizována rApfA ve dvou jednotlivých dávkách po 100 μg antigenu na dávku. Křivky znázorněné v panelu A reprezentují nárůst hladin specifických protilátek proti rApfA v uvedených časových bodech (průměr hladin získaný analýsou jednotlivých sér všech pěti prasat). Den 0 – před vakcinací, den 7 – sedm dní po vakcinaci, den 14 – před revakcinací, den 28 – čtrnáct dní po revakcinaci. Křivky v panelu B pak znázorňují hladiny protilátek proti proteinům lyzátu *E. coli* v týchž časových bodech v daných sérech (opět průměr hladin získaný analýsou jednotlivých sér všech pěti prasat).

6.2.3.2 Stanovení LD_{50} *A. pleuropneumoniae* sérotypu 9 pro prasata

Pro určení 50% letální dávky *A. pleuropneumoniae* sérotypu 9 pro použítá experimentální prasata byly infikovány tři skupiny po čtyřech prasatech postupně jednotlivou intranasální dávkou *A. pleuropneumoniae* a to v koncentracích 3×10^6 , 1×10^7 a 2×10^8 CFU.

U dvou nižších infekčních dávek postupně narůstal výskyt závažnějších příznaků pleuropneumonie, nicméně až u nejvyšší dávky, tedy 2×10^8 CFU došlo k prvním úhynům prasat. Vzhledem ke skutečnosti, že v této skupině uhynula právě polovina experimentálních zvířat, byla infekční dávka 2×10^8 CFU vzata jako LD_{50} pro další experimenty. Tato se ukázala být optimální v obou čelených experimentech (viz kap. 6.2.3.3) vzhledem k počtu úhynů prasat v kontrolních (neimunizovaných) skupinách (Tab. 10).

Tab. 10: Stanovení LD₅₀ dávky *A. pleuropneumoniae* pro prasata.

Prase č.	Infekční dávka (CFU) ¹	Den 0	Den 1 ²	Den 2	Den 3	Den 4
1	3 x 10 ⁶	Infekce <i>A. pleuropneumoniae</i> serotyp 9	-	-	-	-
2			*	*	*	*
3			-	-	-	-
4			*	*	*	*
5	1 x 10 ⁷		*	*	*	*
6			*	*	*	*
7			-	-	-	-
8			*	*	*	*
9	2 x 10 ⁸		†			
10			*	*	*	*
11			*	*	*	*
12			†			

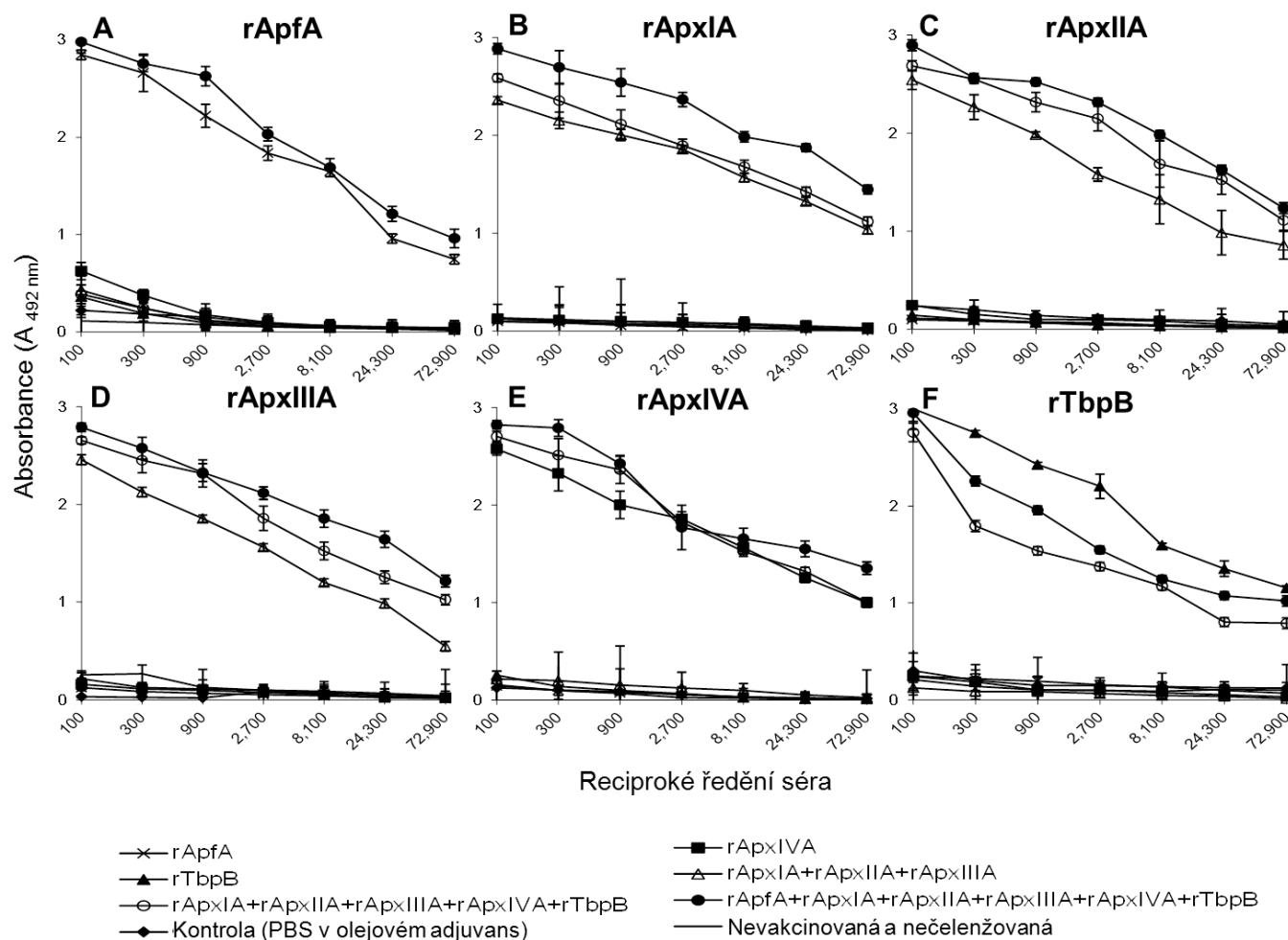
¹Třem skupinám po čtyřech prasatech v každé byla v „Den 0“ provedena intranasální infekce uvedenými dávkami *A. pleuropneumoniae* sérotypu 9.

²Všechna prasata byla sledována po čtyři po sobě jdoucí dny po infekci. Prasata, nevykazující symptomy pleuropneumonie jsou označena symbolem „-“. Prasata, která vykazovala pouze mírné klinické projevy pleuropneumonie jsou označena „*“, „†“ pak reprezentuje úhyn zvířete v průběhu experimentu.

6.2.3.3 Protektivní účinnost experimentální vakcíny proti infekci LD₅₀ *A. pleuropneumoniae* sérotypu 9

Abychom ověřili účinnost různých kombinací rekombinantních antigenů coby vakcíny proti pleuropneumonii prasat, provedli jsme dva nezávislé vakcinační experimenty s následnou infekční dávkou LD₅₀ *A. pleuropneumoniae* sérotypu 9 (Tab. 11).

Post-vakcinační séra ze všech vakcinovaných zvířat byla odebrána den před čelenžním experimentem a testována metodou ELISA (viz kap. 5.11.16) na hladiny protilátek proti všem antigenům použitým v této studii (Obr. 34).



Obr. 34: **ELISA** analýza post-vakcinačních sér ze všech vakcinovaných prasat. Každý z panelů označených A-F zobrazuje titraci protilátek proti příslušnému antigenu v použité vakcíně. Každý bod grafu byl získán jako průměrná hodnota ze stanovení hladin příslušných protilátek v sérech čtyř myší imunizovaných daným antigenem \pm standardní odchylka.

Čelenž všech skupin vakcinovaných prasat byla provedena způsobem popsáným v kap. 5.11.18.3 dávkou 2×10^8 CFU odpovídající LD₅₀. Po sedm následujících dní byla prasata denně sledována a jejich klinický stav byl hodnocen dle následující stupnice: 0, žádné známky prasečí pleuropneumonie; 1, zvýšená respirace, a/nebo občasné kašel, a/nebo občasné polehávání, a/nebo mírná apatie; 2, abdominální respirace, a/nebo kašel, a/nebo polehávání, a/nebo apatie; 3, dušnost, a/nebo neustávající kašel, a/nebo polehávání, a/nebo výrazná apatie, a/nebo krvavý výtok z čenichu a/nebo tlamy, a/nebo agónie; 4, smrt.

Navíc byla též každý den monitorována i tělesná teplota jednotlivých zvířat. Přeživší zvířata byla usmrcena 7. den po provedení čelenže, a stejně jako zvířata uhynulá v průběhu experimentů, byla podrobena nekropsii s odběrem plicní tkáně a hodnocením četnosti výskytu typických plicních lézí. Rozsah těchto lézí byl klasifikován způsobem popsáným v kap. 5.11.18.3. Patologické změny byly popisovány pro jednotlivé plicní laloky zvláště (levý a pravý kraniální, střední a kaudální lalok), a následně byla pro každé zvíře ze získaných hodnot vypočtena střední hodnota plicního skóre (viz kap. 5.11.18.3). Vzorky plicních tkání byly podrobeny též histopatologickým vyšetřením (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno, Česká Republika) (výsledky nejsou ukázány).

Pro průkaz či vyvrácení přítomnosti *A. pleuropneumoniae* v odebraných vzorcích plicní tkáně byly tyto otištěny na misky s krevním agarem č. 4 obsahujícím 6% defibrinovanou beraní krev (kap. 5.11.18.4). Suspektní kolonie byly testovány, jak je popsáno v kap. 4.11.22.4. Následná identifikace kolonií *A. pleuropneumoniae* byla provedena pomocí komerčního testu API NH v3.0 (bioMérieux, Durham, USA) a sérotyp zjištěn sérotypizací koaglutinačním testem dle Mittala (Mittal, 1993) v modifikaci dle Kučerová et al., 2005 (Kucerova, 2005) a metodou PCR (Chiers, 2001)(kap. 5.11.18.4).

Data uvedená v Tab. 11 jsou průměrem hodnot získaných ze dvou po sobě jdoucích čelenžních experimentů obdobného uspořádání.

Z výsledků dosažených v této části disertační práce je tedy možné uzavřít, že byly připraveny rekombinantní antigeny, které jsou schopny jednotlivě indukovat silné imunitní odpovědi po experimentální imunizaci (myš, prase). Použití vakcíny obsahující směs těchto antigenů pak vede k navození imunity proti heterologní čelenži *A. pleuropneumoniae* sérotypu 9 v přirozeném hostiteli (prase). U nejméně 50% prasat též imunizace umožnila předejít kolonizaci plicní tkáně bakterií *A. pleuropneumoniae* po čelenži dávkou LD₅₀.

Tab. 11: Experimentální heterologní čelenž prasat intranasální dávkou LD₅₀ *A. pleuropneumoniae* sérotyp 9.

Vakcína ¹	Počet prasat ²	Klinické projevy - skóre ³	Tělesná teplota (°C) ⁴	Plicní léze – skóre ⁵	Reizolace čelenžního kmene (%) ⁶
rApfA	6 + 6	1.7 ± 0.7 ⁷	40.3 ± 0.5 ⁷	1.3 ± 0.7 ⁷	58 ⁷
rApxIVA	3 + 0	2.6 ± 0.5	40.8 ± 0.4	1.8 ± 0.5	100
rTbpB	3 + 0	2.7 ± 0.5	40.9 ± 0.5	1.9 ± 0.7	100
rApxIA+rApxIIA+rApxIIIA	3 + 0	1.9 ± 0.7	40.5 ± 0.4	1.5 ± 0.6	100
rApxIA+rApxIIA+rApxIIIA+rApxIVA+rTbpB	3 + 4	1.2 ± 0.5 ⁷	39.9 ± 0.4 ⁷	1.0 ± 0.6 ⁷	86
rApfA+rApxIA+rApxIIA+rApxIIIA+rApxIVA+rTbpB	3 + 4	0.3 ± 0.5 ^{7,8}	39.6 ± 0.5 ⁷	0.3 ± 0.5 ^{7,8}	29 ⁷
Kontrola (PBS v olejovém adjuvans)	3 + 4*	3.2 ± 0.7	41.2 ± 0.4	2.3 ± 0.7	100
Nevakcinovaná a neimunizovaná	1 + 1	0	39.1 ± 0.4	0	0

¹Prasata byla imunizována dvěma dávkami příslušné vakcíny ve dvoutýdenních intervalech a následně čelenžována intranasálně *A. pleuropneumoniae* sérotyp 9 (2×10⁸ CFU).

²Byly provedeny dvě nezávislé imunizace a následující intranasální infekce. Zde je uveden počet prasat v příslušné skupině v každém z těchto dvou experimentů.

³Šedm po sobě jdoucích dní po provedené čelenži dávkou LD₅₀ byly u všech prasat monitorovány klinické projevy onemocnění. Tyto projevy byly hodnoceny podle stupnice 0-4, dle stupně závažnosti. Uvedené hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr hodnot získaný z obou experimentů ± směrodatná odchylka.

⁴Šedm po sobě jdoucích dní po provedené čelenži byla též u všech prasat monitorována tělesná teplota. Uvedené hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr hodnot získaný z obou experimentů ± směrodatná odchylka.

⁵Přeživší zvířata byla usmrcena 7. den po provedení čelenže a stejně tak jako zvířata uhynulá v průběhu experimentů byla podrobena nekropsii s odběrem plicní tkáně a hodnocením četnosti výskytu typických plicních lézí. Rozsah těchto lézí byl klasifikován způsobem popsaným podle stupně závažnosti hodnotami v rozsahu 0-3. Uvedené hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr hodnot získaný z obou experimentů \pm směrodatná odchylka.

⁶Procento prasat v každé skupině pozitivních na přítomnost *A. pleuropneumoniae* v plicní tkáni (po reisolaci).

⁷Statisticky významný rozdíl (P větší než 0,02) mezi vakcinovanou a kontrolní nevakcinovanou skupinou.

⁸Statisticky významný rozdíl (P větší než 0,02) mezi skupinou vakcinovanou hexavakcínou (rApfA, rApxI-IVA a rTbpB) a skupinou vakcinovanou pentavakcínou (rApxI-IVA a rTbpB).

7 DISKUSE

7.1 Diskuse výsledků studia SPM z bakterie *N. meningitidis*

7.1.1 SPM DOMÉNA FRPC JAKO SOUČÁST SYSTÉMU UMOŽŇUJÍCÍHO AFINITNÍ PURIFIKACI ROZPUSTNÝCH REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ

První část této disertační práce byla zaměřena na studium vlastností a využití autokatalytického štěpení rekombinantního samoštěpícího modulu (SPM) pocházejícího z proteinu FrpC bakterie *N. meningitidis*. Bylo ukázáno, že pokud je na C-konec SPM umístěna některá z běžně používaných purifikačních kotev (např. 6×His, CBD) lze SPM modul použít jako samoštěpící purifikační kotvu vhodnou k purifikaci různých rekombinantních proteinů.

Jako modelové fúzní rekombinantní proteiny pro studium SPM-zprostředkovaného štěpení byly zvoleny GST-SPM-C-His a MalE-SPM-CBD. Bylo ukázáno, že jak pro fúzi SPM-C-His, tak i pro fúzi SPM-CBD v kombinaci s GST, resp. MalE, nedochází ke ztrátě ani ke snížení specifity a účinnosti samoštěpící aktivity SPM. Inkubace obou uvedených fúzních proteinů při 37 °C v přítomnosti 2 mM vápenatých iontů vedla k rychlému štěpení s kinetikou srovnatelnou se štěpením původního proteinu FrpCΔRTX (Obr. 12A, B). Nicméně, pokud byly porovnány kinetiky štěpení při teplotách nižších než 37 °C, bylo patrné zpomalení průběhu reakce u MalE-SPM-CBD oproti FrpCΔRTX (data nejsou ukázána). To může být zapříčiněno odlišnou konformací MalE části, například kvůli částečné blokaci dostupnosti vazby Asp₄₁₄-Pro₄₁₅. I přes výše uvedené je však štěpení vazby Asp₄₁₄-Pro₄₁₅ v MalE-SPM-CBD dostatečně účinné na to, aby bylo možno využít SPM-zprostředkovaného štěpení i za snížených teplot. To je obzvlášť důležité pro purifikaci řady rekombinantních proteinů.

Dále jsme ověřili, zda u enzymaticky aktivních proteinů purifikovaných pomocí systému založeného na doméně SPM, zůstane zachována jejich enzymatická aktivita. K tomu jsme použili reporterové enzymy chloramfenikol acetyltransferasu a β-galaktosidasu. Tyto enzymy byly vybrány proto, že po jejich N- i C-koncové fúzi k jinému proteinu dochází pouze k malému snížení jejich specifické enzymatické aktivity (Marchesini, 2004; Norton, 1985; Kenny, 1991). Navíc je stanovení jejich specifické aktivity poměrně snadné, robustní a reprodukovatelné. Porovnání specifických aktivit purifikovaných volných forem N-His-CAT i LacZ-C-His s hodnotami získanými pro stejné proteiny po jejich vyštěpení z příslušných fúzních proteinů ukázalo, že při purifikaci využívající afinitní kotvu SPM-CBD nedochází ke snížení specifické enzymatické aktivity těchto proteinů (Tab. 4).

Fúzní proteiny použité v této práci byly vysoce stabilní jak v komplexních bakteriálních lyzátech, tak v průběhu celého purifikačního procesu. Proto nebylo nutné při zpracování přidávat inhibitory proteáz. Ty ovšem lze v případě potřeby použít, protože SPM-zprostředkované štěpení není inhibováno žádným z konvenčních inhibitorů proteáz, vyjma činidel chelatujících vápenaté ionty (Osicka, 2004).

Pro některé proteázy bylo ukázáno, že přítomnost určitých typů aminokyselinových zbytků v jejich sekvenci brání štěpení peptidové vazby (Shuker, 2003; Chu, 2007). Podobně je tomu i v případě štěpení peptidové vazby mezi inteinem a požadovaným proteinem při purifikaci rekombinantních proteinů fúzovaných s intein-CBD afinitní kotvou. Ke štěpení fúzního proteinu nedochází, pokud vazbě na intein předchází asparaginový, cysteinový, nebo prolinový aminokyselinový zbytek (pozn. IMPACT-CN na www.neb.com). V případě SPM-zprostředkovaného štěpení fúzních proteinů jsme testovali jaký vliv na účinnost štěpení Asp₄₁₄-Pro₄₁₅ vazby mají následující aminokyselinové zbytky: alanin, glutamát, histidin, serin, tryptofan, tyrosin a valin. Přítomnost žádného z nich před místem štěpení neovlivnila štěpení samotné, ani jeho kinetiku (Osicka, 2004). Je tedy pravděpodobné, že pro účinné štěpení vazby Asp₄₁₄-Pro₄₁₅ není nutná přítomnost jakéhokoli dalšího aminokyselinového zbytku před touto vazbou. Dále lze též konstatovat, že SPM-zprostředkované štěpení vazby Asp₄₁₄-Pro₄₁₅ je vysoce specifické a dochází ke štěpení výhradně této vazby. Nepozorovali jsme štěpení žádných jiných vazeb Asp-Pro přítomných v použitých fúzních proteinech (např. četnost Asp-Pro vazeb činí v: GST - 1, MalE - 1, LacZ - 4). Vzhledem ke specifitě štěpení SPM, pak mají všechny požadované proteiny homogenní C-koncovou část, na které nesou pouze jediný přidaný aspartátový zbytek navíc proti původní sekvenci. Toto bylo prokázáno též hmotově-spektrometrickou analýzou AC domény po odštěpení z fúze AC-SPM-CBD (Obr. 16).

Nedávno byl navržen možný reakční mechanismus vápníkem-indukovaného štěpení proteinu FrpC a následná tvorba jeho dalších vysokomolekulových forem za vzniku isopeptidových vazeb (Osicka, 2004). Tento proces je zahájen vazbou vápenatých iontů na SPM a následnou konformační změnou SPM molekuly, která umožní interakci mezi doposud necharakterizovaným aminokyselinovým zbytkem molekuly FrpC a zbytkem Pro₄₁₅. Po protonaci Pro₄₁₅ pak následuje nukleofilní atak β -karboxy skupiny karbonylu Asp₄₁₄ a rozpad jeho amidové vazby na zbytek Pro₄₁₅. Dále dochází k tvorbě reaktivního anhydridu na zbytku Asp₄₁₄, který může hydrolyzovat, nebo může být atakován ϵ -aminoskupinou lysinu jiné proteinové molekuly a reagovat s ní za vzniku nové isopeptidové amidové vazby mezi zbytky Asp a Lys (Obr. 7A, B). Tuto aktivitu jsme nepozorovali u purifikovaných GST-SPM-His a

MalE-SPM-CBD fúzních proteinů, pokud jejich autokatalytické štěpení probíhalo v roztoku. Pokud v průběhu afinitní purifikace probíhalo štěpení uvedených proteinů po vazbě ve vysoké lokální koncentraci na afinitní matrici za přítomnosti 10 mM DTT, byly výtěžky eluovaného odštěpeného GST a MalE proteinu mnohonásobně vyšší. To nás navedlo na myšlenku, že přítomnost redukčního činidla v průběhu štěpení proteinu brání tvorbě isopeptidových vazeb a vzniku nežádoucích vysokomolekulových a kovalentně provázaných forem proteinu. Tedy, že pro zvýšení výtěžnosti purifikačního postupu, je nutné inhibovat vznik isopeptidových vazeb a tvorbu komplexů, které zůstanou zachyceny v afinitní matrici. Podstatou působení redukčního činidla pak nejspíše je, že thiolové skupiny DTT, či cysteinu, tvoří thioesterové vazby s anhydridem vzniklým na C-koncovém aspartátovém zbytku (Asp₄₁₄ FrpC) odštěpeného proteinu (Obr. 7B). DTT je následně z Asp zbytku odstraněn hydrolýzou ve vodném prostředí. U thioesteru cysteinového zbytku ovšem dochází ke spontánnímu S-N přesmyku, jehož výsledkem je tvorba peptidové vazby mezi cysteinem a C-koncovým Asp požadovaného proteinu (Obr. 7A, B). Z uvedeného důvodu je v průběhu purifikačního postupu výhodnější k tvorbě redukčního prostředí použít DTT, a získat tak požadovaný protein po štěpení pouze s jediným Asp zbytkem přidaným na C-konec proteinu, zatímco při použití cysteinu po štěpení zůstává na proteinu C-koncový dipetid Asp-Cys.

Thiolové sloučeniny se používají jako redukční činidlo při purifikaci fúzních proteinů pomocí inteinové samoštěpitelné afinitní kotvy. Zde však slouží k samotné iniciaci štěpení fúzního proteinu. Podobně jako v případě štěpení zprostředkovaného SPM, je i po štěpení inteinem DTT hydrolyzován z výsledného uvolněného proteinu, zatímco v případě cysteinu dochází opět k tvorbě kovalentní vazby cysteinu k C-koncovému zbytku proteinu (Chong, 1997). Tato pozorování jsme potvrdili na vzorku trypsinových štěpů AC proteinu uvolněného po štěpení fúze AC-intein-CBD a to s použitím metody hmotnostní spektrometrie ve vysokém rozlišení (Tab. 5).

Primární aminy (methylamin či ethylamin) se ukázaly jako nevhodné pro zablokování tvorby vysokomolekulových forem fúzního proteinu po štěpení SPM, protože nedokáží kompetovat s ϵ -amino skupinami lysinových zbytků o tvorbu vazby s C-koncovým volným Asp zbytkem odštěpeného proteinu.

Závěrem této části lze tedy konstatovat, že s využitím afinitní kotvy odvozené od SPM domény proteinu FrpC byl zaveden nový purifikační systém, který umožňuje jednoduše, specificky, rychle a levně produkovat volné rozpustné rekombinantní proteiny.

7.1.2 STRUKTURNÍ ANALÝZA SPM DOMÉNY FRPC

Pro studium vztahů mezi funkcí a strukturou štěpícího modulu SPM jsme připravili sadu zkrácených variant sekvence SPM fúzovaných s proteinem GST a s histidinovou afinitní kotvou (Obr. 20, 21). Na základě analýzy štěpení těchto zkrácených proteinů jsme definovali minimální část sekvence SPM, která je nezbytná pro zachování štěpící aktivity (Tab. 6). Stejným způsobem jsme postupovali též v případě charakterizace SPM_{IV} domény pocházející z proteinu ApxIVA bakterie *A. pleuropneumoniae* (Obr. 23). I u tohoto samoštěpitelného modulu je za štěpící aktivitu odpovědná sekvence SPM_{IV} o identické délce (aminokyselinové zbytky 1-169, odpovídající 637-806 v celistvém ApxIVA proteinu) (Tab. 7 a Obr. 24).

Struktura SPM byla charakterizována pomocí metody nukleární magnetické rezonance (NMR). Nejprve byla provedena měření a analýzy ve spektru ¹H, následně pak též ve spektru ¹³C a ¹⁵N. Veškeré experimenty byly provedeny s isotopově (¹³C a ¹⁵N) značeným vzorkem proteinu SPM₁₇₇-His. Na základě získaných experimentálních dat (frekvencí přepočítaných na chemické posuny jader) byla provedena předběžná predikce sekundárních motivů v proteinu SPM₁₇₇.

Dále byla analyzována NOESY spektra v programu ARIA 2.1 a získané meziatomové vzdálenosti byly použity k výpočtu struktury ve vakuu pomocí protokolů molekulové dynamiky inkorporovaných v programu CNS a s následnou rafinací ve vodném prostředí. Z výsledků analýzy ¹H spekter je patrné, že v přítomnosti vápenatých iontů dochází ke vzniku struktury proteinu SPM₁₇₇, zatímco v jejich nepřítomnosti protein zůstává nestrukturovaný a zaujímá konformaci náhodného klubka (Obr. 30). Všechny výsledky provedených analýz ukazují, že zbytky Asp₄₁₄ a Asp₅₇₉ FrpC se ve strukturovaném SPM nacházejí v těsné blízkosti (jde o zbytky Asp₁ a Asp₁₆₅ proteinu SPM₁₇₇-His). Struktura SPM nebyla zatím zcela vyřešena, ale z doposud získaných dat lze usuzovat, že právě v těchto oblastech sekvence domény SPM dochází v přítomnosti vápenatých iontů k vytvoření katalytického jádra zodpovědného za štěpící aktivitu.

Tyto závěry rovněž podporují výsledky mutagenese zbytku Asp₅₇₉ proteinu FrpC (Asp₁₆₅ v proteinu SPM₁₇₇-His). Při záměně Asp₅₇₉ za glutamátový zbytek nesoucí karboxylovou skupinu dojde pouze k částečnému snížení štěpící aktivity. Záměna Asp₅₇₉ za alanin, či asparagin, pak vede ke ztrátě štěpící aktivity (Obr. 29). Stejného efektu je dosaženo při substituci Asp₁ proteinu SPM₁₇₇-His (tedy Asp₄₁₄ ve FrpC), kdy jeho nahrazení zbytkem glutamátu vede ke snížení štěpící aktivity a nahrazení zbytkem alaninu nebo asparaginu pak vede k naprosté ztrátě aktivity SPM₁₇₇-His (Osicka, 2004). Tyto závěry jsou ve shodě s dříve

navrženým mechanismem autokatalytického štěpení FrpC (kap. 3.3.3.2, Obr. 7B), který předpokládá přítomnost volné karboxy skupiny (Osicka, 2004)).

Navržené hypotézy o tvorbě katalytického jádra potvrzují rovněž výsledky získané mutagenézí N-koncového oktapeptidu SPM₁₇₇-His (Tab.8, Obr. 31) a možnost nahradit SPM doménu v proteinu FrpC doménou SPM_{IV} proteinu ApxIVA bakterie *A. pleuropneumonie*. Podobné domény byly nalezeny také u jiných nedávno objevených RTX proteinů, jejichž biologické funkce nejsou známy. Tyto proteiny jsou produkovány například bakteriemi *Actinobacillus pleuropneumonie*, *Xylella fastidiosa*, *Ralstonia solanacearum* a *Rhizobium leguminosarum* (Osicka, 2001; Osicka, 2004). U proteinu ApxIVA bylo prokázáno, že se stejně jako protein FrpC autokatalyticky štěpí v přítomnosti vápenatých iontů mezi zbytky Asp⁶³⁸ a Pro⁶³⁹, a že i v případě ApxIVA dochází k tvorbě stabilních vysokomolekulových forem proteinu provázaných isopeptidovými vazbami (Osicka, 2004).

Mutagenézí aminokyselin N-koncového oktapeptidu SPM pak bylo zjištěno, že jakákoli jednoduchá, či dvojitá záměna v této části sekvence SPM vede ke zrušení autokatalytické aktivity. Ke ztrátě aktivity SPM docházelo, i když provedené záměny na N-konec SPM vnesly oktapeptidy pocházející ze sekvenčních homologů SPM z jiných bakteriálních proteinů (kap. 6.1.1.4.1, Tab. 8, Obr. 31). Štěpící aktivita FrpC zůstala plně zachována pouze, pokud sekvence původního SPM₁₇₇ byla nahrazena sekvencí SPM_{IV177} z proteinu ApxIVA. Ten má identický N-koncový oktapeptid jako SPM z FrpC a má zachovaný Asp zbytek v pozici 165 (kap. 6.1.1.2.7, Obr. 25, 26).

Aminokyselinová sekvence SPM není podobná žádnému proteinu o známé biologické funkci. Podobná vápníkem-indukovatelná autokatalytická aktivita sloužící k rozštěpení peptidové vazby Asp-Pro nebyla zatím popsána u žádného jiného typu proteinů. Všechna doposud získaná data pak jsou v souladu s dříve navrženým reakčním mechanismem štěpení proteinu FrpC (Osicka, 2004). Pro definitivní potvrzení tohoto mechanismu nyní usilujeme o vyřešení kompletní struktury molekuly SPM. Pro objasnění biologické aktivity proteinu FrpC bude ovšem nezbytné nalézt relevantní biologický model meningokokové infekce, ve kterém bude možno testovat fenotyp mutací vedoucích ke ztrátě štěpící aktivity FrpC.

7.2 Diskuse účinnosti nově vyvinuté rekombinantní vakcíny proti aktinobacilové pleuropneumonii

Pleuropneumonie je vysoce rozšířené infekční onemocnění ve velkochovech prasat po celém světě. Vzhledem k vysoké mortalitě, růstové retardaci a zvýšené spotřebě antibiotik, má celkově obrovský negativní dopad na hospodářství průmyslu chovu prasat. Za účelem

ochrany prasat proti této infekci vyvolávané bakterií *A. pleuropneumoniae* bylo v minulosti vyvinuto mnoho typů nepříliš účinných vakcín. Jednalo se o vakcíny celobuněčné, vakcíny obsahující živé, ale oslabené mikroorganismy, a taktéž o vakcíny podjednotkové. Všechny tyto vakcíny jsou z obecného hlediska schopny snížit mortalitu prasat a nejvýznamnější klinické projevy pleuropneumonie. Žádná z nich ovšem neposkytuje ochranu před celým spektrem existujících sérotypů *A. pleuropneumoniae* a neumožňuje ani zabránit kolonizaci respiračního traktu infekčním agens (Chiers, 1998; Haga, 1997; Wang, 2009; Rossi-Campos, 1992). Proto trvá potřeba vyvinout vakcínu, jejíž složení by řešilo tyto dva hlavní nedostatky. V poslední dekádě bylo za tímto účelem testováno několik různých proteinových preparací Apx toxinů a různých typů vnějších membránových frakcí, jakož i několik zcela nových proteinových antigenů. Mezi ty patří též ApfA podjednotka fimbrií typu IV bakterie *A. pleuropneumoniae*.

V této práci jsme testovali imunogenicitu a protektivní potenciál rekombinantního ApfA v modelu prasečí pleuropneumonie, a to jak pro samotné ApfA coby jednosložkové vakcíny, tak v kombinaci s dalšími antigeny. Mezi tyto antigeny patří čtyři RTX exotoxiny (ApxIA-ApxIVA) a transferin-vázající protein B, TbpB (Chiers, 1998; Haga, 1997; Wang, 2009; Rossi-Campos, 1992; Van Overbeke, 2002).

Dříve bylo ukázáno, že pokud byly rekombinantní ApxIIA a TbpB proteiny použity k vakcinacím jednotlivě, došlo u všech experimentálních prasat k navození silné protilátkové odpovědi a po čelení homologním kmenem *A. pleuropneumoniae* sérotypu 7 vykazovala všechna prasata významně nižší mortalitu, než prasata v kontrolní neimunizované skupině (Rossi-Campos, 1992). Nicméně protektivní účinky byly vysoce sérotypově specifické. U uvedených prasat nebyla prokázána žádná protektivní účinnost proti čelení *A. pleuropneumoniae* sérotypu 1 (Rossi-Campos, 1992). Zatímco s jednotlivě podávanými ApxIIA a TbpB proteiny nebylo možné dosáhnout uspokojivých výsledků, u prasat, která byla imunizována jejich kombinací, došlo k výrazně rychlejšímu uzdravení a k omezení rozvoje těžkých klinických příznaků onemocnění (Rossi-Campos, 1992).

Nedávno byl také testován efekt vakcinace N-koncovým fragmentem ApxIVA produkovaným v *E. coli*, nicméně i přes navození vysoké hladiny specifických sérových protilátek vykazovala vakcinovaná prasata stejně těžké respirační příznaky a rozsáhlé plicní léze, jako nevakcinovaná prasata v kontrolní skupině (Wang, 2009). Ve srovnání s prasaty vakcinovanými pouze samotným N-koncovým fragmentem ApxIVA, byl pozorován významný rozvoj protektivní imunity vakcinovaných prasat po přidavku rekombinantních ApxIA, ApxIIA, ApxIIIA proteinů a membránového proteinu o velikosti 42-kDa (Wang, 2009).

Data získaná v této práci ukazují, že aplikace rekombinantních rApfA, rApxIA-rApxIVA a rTbpB proteinů navozuje vysoké hladiny specifických protilátek u očkovaných prasat. Vakcinace nezkrácenou původní variantou rApxIVA a TbpB, jednotlivě, nebo i kombinací rApxIA, rApxIIA a rApxIIIA, umožní ochranu prasat před letálním průběhem infekce po heterologní čelení *A. pleuropneumoniae* sérotypu 9. Přesto však dochází k plnému rozvoji klinických příznaků onemocnění, jakož i k masivnímu poškození plicní tkáně. Na druhé straně prasata imunizovaná pouze rekombinantním rApfA, nebo zvířata imunizovaná trojkombinací rApxIA, rApxIIA a rApxIIIA, vykazují po čelení stejným sérotypem výrazně mírnější klinické příznaky a redukované poškození plicní tkáně, nežli prasata imunizovaná samotným rApxIVA, nebo TbpB. (Tab. 11).

Proto byla v této práci ověřena možnost amplifikace celkového protektivního účinku antigenu rApfA v kombinaci se čtyřmi toxoidy rApxIA až rApxIVA a proteinem rTbpB (celkem 6 antigenů). Bylo ukázáno, že takto připravená vakcína aplikovaná ve stejném schématu jako samotný rApfA zajišťuje výrazně vyšší protektivní imunitu ve srovnání s vakcinací pouze jednotlivými rApfA, rApxIVA a rTbpB antigeny, nebo po použití trojkombinace obsahující rApxIA, rApxIIA, rApxIIIA. Ochrana vyvolaná přídavkem ApfA byla ještě vyšší než jakou bylo možno dosáhnout po vakcinaci pětisložkovou směsí antigenů rApxIA až rApxIVA a rTbpB (Tab. 11). Je tedy možné konstatovat, že přídavek rApfA významně zvyšuje protektivní potenciál podjednotkové vakcíny skládající se z běžně užívaných Apx a TbpB antigenů. Imunizace prasat touto novou hexavakcínou navíc zajišťuje kompletní ochranu před heterologní čelení *A. pleuropneumoniae* sérotypu 9, který je jedním ze dvou hlavních původců aktinobacilové pleuropneumonie v České republice a ve Střední Evropě (KucEROVA, 2005).

Bylo ukázáno, že usmrcené celobuněčné vakcíny odvozené z buněk *A. pleuropneumoniae* kultivovaných *in vitro* vykazují obvykle sérotypově specifickou ochranu, zatímco přirozená či experimentální infekce obecně vede ke zkřížené sérotypové ochraně (Nielsen, 1984; Cruijsen, 1995a; Haesebrouck, 2004). To může naznačovat, že antigeny zodpovědné za zkříženou protektivní imunitu jsou exprimovány výhradně *in vivo*, v průběhu infekce, a ne při kultivaci *A. pleuropneumoniae in vitro*. Jedním z antigenů, který by mohl odpovídat za tento fenomén je ApfA. Bylo popsáno, že tento protein je produkován pouze *in vivo* po kontaktu *A. pleuropneumoniae* s epiteliemi respiračního traktu hostitele (Boekema, 2004b). Toto pozorování podporují i výsledky získané v této práci. Zde bylo ukázáno, že imunizace samotným rApfA antigenem vede k navození částečné, ale významně vyšší ochrany proti heterologní infekci *A. pleuropneumoniae* sérotypu 9, než jaké je možno

dosáhnout se kterýmkoliv z již dříve běžně používaných antigenů, včetně ApxIVA nebo TbpB (Tab. 11).

V jedné z dřívějších prací byl v myším modelu pozorován zdánlivě imunosupresivní efekt ApfA jako jedné z komponent rekombinantní podjednotkové vakcíny obsahující dále proteiny rApxIA, rApxIIA, rApxIIIA a rOMP (Shao, 2010). Bylo ukázáno, že hladiny protilátek proti jednotlivým složkám vakcíny byly významně nižší v sérech myší, které byly imunizovány vakcínou obsahující též rApfA, než byly hladiny protilátek u myší imunizovaných vakcínou bez ApfA a obsahující rApxI až IIIA a rOMP (Shao, 2010). Frekvence přežívání myší s vyšší hladinou protilátek byla po čelení *A. pleuropneumoniae* vyšší než u myší imunizovaných vakcínou s přídavkem rApfA. Mohlo by se tedy zdát, že použití rApfA vakcíně potlačuje imunitní reakce u myší (Shao, 2010). Něco podobného bylo prezentováno po očkování prasat jiným proteinem vnější membrány *A. pleuropneumoniae*, PalA (van den Bosch, 2003). Nicméně, experimentální data získaná v naší práci jasně demonstrují, že přídavek rApfA do vakcíny zvyšuje imunitní reakci prasat. Jak je patrné z obrázku 32, postvakcinační séra prasat imunizovaných šestisložkovou vakcínou obsahující rApfA, rApxI-IVA a rTbpB vykazují vyšší, či srovnatelné hladiny protilátek specifických pro rApxI až IIIA nežli séra zvířat imunizovaných pětisložkovou vakcínou obsahující rApxI -IVA a TbpB, bez ApfA. Navíc, v případě imunizace šestisložkovou vakcínou je patrný též významně vyšší protektivní účinek proti klinickým příznakům pleuropneumonie, než po použití pětisložkové vakcíny bez rApfA (Tab. 11).

Pro svou klíčovou roli ve virulenci mnoha druhů gramnegativních bakterií byly a jsou fimbrie typu IV testovány jako potenciální složky podjednotkových vakcín pro prevenci mnoha infekčních onemocnění. Například, purifikované fimbrie *Dichelobacter nodosus* zajišťují vysokou úroveň ochrany proti homologní interdigitální dermatitidě ovcí. V případě infekce vyvolané kmenem heterologního sérotypu je pak popsána protektivita nižší (Stewart, 1987). Podobně, imunizace fimbriemi typu IV izolovanými z různých kmenů *Moraxella bovis* účinným způsobem chrání hovězí dobytek před infekční keratokonjunktivitidou vyvolanou homologním kmenem. Při heterologní experimentální infekci ovšem účinek ochrany výrazně klesá (Lepper, 1992). Navíc, inverze genu kódujícího fimbrie umožňuje změnu jejich antigenicity a dává tak bakterii možnost úniku před efekty protektivní imunitní odpovědi organismu hostitele {Lepper, 1995, 7571364}. Tato tzv. antigenní variace pilinových podjednotek je taktéž jednou z významných překážek ve vývoji účinné vakcíny proti onemocnění vyvolávanému bakterií *Neisseria gonorrhoeae* (Boslego, 1991). Antigenní variace pili u *Neisseriaceae* je důsledkem konverze při které dochází k rekombinaci DNA

sekvence neexprimovaného lokusu do lokusu s vysokou frekvencí exprese pili (Criss, 2005; Hagblom, 1985). V této práci jsme ukázali, že i přes vysoké titry protilátek proti rApfA, vede vakcinace samotným ApfA antigenem pouze k částečné ochraně před heterologní čelenží *A. pleuropneumoniae*. Na druhé straně je známo, že alely *apfA* jsou vysoce konzervované mezi jednotlivými sérotypy *A. pleuropneumoniae* a v celém genomu bakterie je pouze jediná kopie genu *apfA* (Boekema et al., 2004). Není tedy pravděpodobné, že by ona částečná ochrana experimentálních zvířat po heterologní infekci byla zapříčiněna nedostatečnou úrovní sekvenční homologie ApfA, nebo antigenní variací ApfA čelenžního kmene. Snížená účinnost vakcíny tvořené samotným rApfA je pravděpodobně dána existencí dalších molekul, které se účastní počátečních kroků adheze *A. pleuropneumoniae* k buňkám hostitelských respiračních epitelů v patogenezi pleuropneumonie (Dom, 1994a; Haesebrouck, 1997). Bylo například ukázáno, že O-antigen lipopolysacharidu buněčné stěny hraje roli ve vazbě *A. pleuropneumoniae* na fosfatidylethanolamin buněčných membrán hostitele, a tím přispívá ke zmíněnému iniciálnímu kontaktu – např. možným vlivem na vazbu receptorů (Jeannotte, 2003).

Těž pro 55 kDa velký protein z vnější membrány *A. pleuropneumoniae*, bylo *ex vivo* ukázáno, že je schopen zprostředkovat adhezi bakterie k prasečím alveolárním epiteliálním buňkám (Van Overbeke, 2002). Na základě uvedených pozorování se zdá, že podobně jako u jiných bakteriálních druhů se i v případě *A. pleuropneumoniae* jedná o několikastupňový proces adheze. V prvním kroku dochází pomocí fimbrií typu IV vyčnívajících z povrchu bakteriální buňky k interakci "na dálku" s cukernými strukturami epiteliálních buněk. Následně dochází k retrakci pili a přiblížení membrán bakterie a buňky a následné interakci OMP s epiteliálními receptory a naopak vazbě buněčných receptorů s O antigenem a fosfolipidy bakteriální stěny. Tím je umožněn úzký kontakt bakterie s hostitelskou buňkou prostřednictvím buněčných receptorů (Jeannotte, 2003). Popsaný proces je pravděpodobnou příčinou toho, že vakcína založená pouze na rApfA není schopna plně ochránit imunizovaná zvířata před kolonizací *A. pleuropneumoniae* po experimentálně provedené heterologní čelenži, neboť bakteriální adheze se nejspíše účastní několik paralelních mechanismů. Přesto jsme pozorovali, že po čelenži *A. pleuropneumoniae* omezuje přítomnost specifických anti-ApfA protilátek v sérech imunizovaných zvířat schopnost patogena množit se na buňkách respiračního epitelu až u třetiny infikovaných zvířat. Naproti tomu, po imunizaci vakcínou bez přídavku rApfA, bylo možno bakterie *A. pleuropneumoniae* detekovat v plicním parenchymu všech infikovaných prasat.

A. pleuropneumoniae je jedním z původců primárních bakteriálních pneumonií prasat (20 % všech případů). Pouze třicet procent z těchto případů však probíhá nekomplikovaně, bez přispěvku jiných patogenů. Ve většině ostatních případů dochází ke koinfekci bakterií *Pasteurella multocida* (Hoeftling, 1998), která výrazným způsobem přispívá k fatálnímu průběhu aktinobacilové pleuropneumonie. *P. multocida* je též nejčastěji izolovaným patogenem kolonizujícím respirační trakt prasat (Ross, 2006), který exprimuje fimbrie typu IV. Jejich podjednotkový protein, PtfA, pak vykazuje více než 65 % homologie s ApfA *A. pleuropneumoniae* (Doughty, 2000). V pilotních experimentech provedených v této práci jsme ukázali, že séra prasat sérologicky negativních na přítomnost *A. pleuropneumoniae* reagují po akutní infekci bakterií *P. multocida* též s purifikovaným rApfA. To naznačuje, že vakcinací pomocí ApfA by mohlo být možné docílit nejen ochrany před infekcí vyvolanou *A. pleuropneumoniae*, ale také alespoň částečnou ochranu před infekcí vyvolanou bakterií *P. multocida*. Tuto hypotézu je ovšem nutné nejdříve otestovat experimentálně.

Závěrem je možné shrnout, že v této práci jsme ukázali, že rekombinantní podjednotku ApfA z fimbrií typu IV bakterie *A. pleuropneumoniae* lze použít jako novou účinnou složku v budoucích generacích vakcín proti aktinobacilové pleuropneumonii prasat. Bylo ukázáno, že přidavek tohoto proteinu výrazně zvyšuje účinnost vakcíny obsahující čtyři Apx antigeny (I-IVA) a protein TbpB, což umožní nejen kompletní ochranu proti klinickým příznakům akutního onemocnění, ale také navodí sérotypově zkříženou imunitu umožňující předcházet vzniku nosičství patogena *A. pleuropneumoniae*.

8 ZÁVĚRY

8.1 Studium mechanismu autokatalytického štěpení RTX proteinu FrpC bakterie *Neisseria meningitidis*

- **PŘÍPRAVA FÚZNÍCH REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ PRO CHARAKTERIZACI AUTOKATALYTICKÝCH VLASTNOSTÍ SAMOŠTĚPITELNÉHO MODULU (SPM) PROTEINU FRPC.**

- Byly amplifikovány geny pro chloramfenikol acetyltransferasu (Cat), β -galaktosidasu (LacZ), glutathion-S-transferasu (GST), maltosu-vázající protein E (MalE) a úsek *cyaA* kódující adenylátcyklasovou doménu (AC).
- Byly zkonstruovány expresní vektory pro produkci fúzních proteinů Cat-SPM-CBD, LacZ-SPM-CBD, GST-SPM-C-His, MalE-SPM-C-His a AC-SPM-CBD. Tyto proteiny byly produkovány a purifikovány.
- U všech uvedených fúzních proteinů byla studována kinetika štěpení a tato porovnána s kinetikou původního FrpC Δ RTX. Bylo pozorováno, že v případě proteinu GST-SPM-C-His, MalE-SPM-C-His a AC-SPM-CBD je kinetika štěpení srovnatelná s kinetikou původního FrpC Δ RTX. U posledního z fúzních proteinů bylo též provedeno porovnání účinnosti purifikačního systému založeného na SPM-CBD s komerčně dostupným systémem založeným na int-CBD. Výsledky tohoto srovnání ukazují, že oba systémy lze u testovaných fúzních proteinů využít se srovnatelnou účinností.
- U fúzních proteinů Cat-SPM-CBD a LacZ-SPM-CBD bylo provedeno srovnání hodnot specifických enzymatických aktivit konvenčně purifikovaných volných proteinů LacZ-C-His a N-His-CAT s aktivitami proteinů purifikovaných systémem založeným na samoštěpitelné afinitní kotvě SPM-CBD.

- **PŘÍPRAVA MUTANTNÍCH VARIANT SPM REKOMBINANTNÍHO PROTEINU FRPC.**

- Byly predikovány *in silico*, a zmapovány *in vitro* metodou parciálních štěpů, ty neesenciální oblasti proteinu SPM, které jsou přístupné štěpení vybranými

proteolytickými enzymy. Tyto oblasti jsou lokalizovány v oblastech SPM₂₃₉, SPM₁₇₇, SPM₁₅₃ a SPM₁₃₄.

- Byla určena minimální část SPM proteinu FrpC zodpovědná za jeho autokatalytickou štěpící aktivitu metodou deleční mutagenese (příprava a charakterizace delečních variant fúzního proteinu GST-SPM-C-His nesoucích zkrácené varianty SPM). Jako esenciální pro zcela zachovanou autokatalytickou štěpící aktivitu se ukázala sekvence SPM o délce 169 aminokyselinových zbytků (SPM₁₆₉).
- Přestože posledním nezbytným aminokyselinovým zbytkem pro zachovanou štěpící aktivitu SPM se ukázal být aminokyselinový zbytek v pozici 169, zcela stabilní štěpitelnou sekvencí je až SPM₁₇₇.
- **STUDIUM STRUKTURY A KINETIKY ŠTĚPENÍ ZKRÁCENÉ FORMY SPM₁₇₇ PROTEINU FRPC**
 - Pomocí ¹H, ¹³Ca ¹⁵N NMR byla studována struktura zkrácené formy SPM₁₇₇ proteinu FrpC. Byla získána předběžná strukturní data ukazující na možnost interakce N- a C-koncové oblasti proteinu SPM₁₇₇ v přítomnosti vápenatých iontů.
 - Byl studován význam konzervovaného zbytku aspartátu v pozici 165 SPM (Asp₁₆₅) ve vztahu k autokatalytické štěpící aktivitě SPM. Bylo ukázáno, že je-li provedena záměna za zbytek glutamátu, dochází k výraznému snížení autokatalytické štěpící aktivity. Je-li však provedena záměna za asparagin či alanin je tato aktivita zcela zrušena.
 - Byl studován vliv aminokyselinového složení N-terminálního konzervovaného oktapeptidu SPM na jeho autokatalytickou štěpící aktivitu. Bylo ukázáno, že jakákoli z provedených aminokyselinových záměn vede ke ztrátě této aktivity.
- **STUDIUM SAMOŠTĚPITELNÉHO MODULU (SPM_{IV}) REKOMBINANTNÍHO PROTEINU APXIVA BAKTERIE A. PLEUROPNEUMONIAE**
 - Byly připraveny mutantní varianty SPM_{IV} rekombinantního proteinu ApxIVA metodou deleční mutagenese (sada delečních variant fúzního proteinu GST-SPM_{IV}-C-

His nesoucích jednotlivé zkrácené varianty SPM_{IV} navržené dle výsledků získaných predikcí a studiem delečních variant proteinu GST-SPM-C-His).

- Jednotlivé zkrácené varianty GST-SPM_{IV}-C-His byly produkovány, purifikovány a byla ověřena jejich štěpitelnost. Kinetika štěpení těchto proteinů byla porovnána s kinetikou štěpení původního FrpCARTX.
- Byla určena minimální aktivní část SPM_{IV} nezbytná k účinnému štěpení fúzního proteinu GST-SPM_{IV}-C-His. Její délka rozsahem odpovídá délce sekvence SPM nezbytné pro účinné štěpení původního FrpCARTX. Jako esenciální pro zcela zachovanou autokatalytickou štěpící aktivitu se ukázala sekvence SPM_{IV} o délce 169 aminokyselinových zbytků (SPM_{IV169}).
- **STUDIUM VLIVU ZÁMĚNY SPM ZA SPM_{IV} V PŮVODNÍM REKOMBINANTNÍM FRPC PROTEINU**
 - Byl připraven expresní vektor pro produkci rekombinantního FrpC proteinu nesoucího sekvenci kódující SPM_{IV} výměnou za sekvenci kódující SPM původního FrpC proteinu.
 - Byl produkován a purifikován protein FrpC-(SPM_{IV})-C-His. Kinetika štěpení tohoto proteinu byla porovnána s kinetikou štěpení původního FrpC proteinu a jejich průběh byl srovnatelný.

8.2 Příprava rekombinantních antigenů bakterie *Actinobacillus pleuropneumoniae* a jejich využití v experimentální vakcíně proti prasečí pleuropneumonii

- **PŘÍPRAVA A POUŽITÍ VYBRANÝCH REKOMBINANTNÍCH ANTIGENŮ *A. PLEUROPNEUMONIAE***
 - Byly amplifikovány a klonovány geny kódující proteiny ApfA, ApxI-IVA a TbpB z *A. pleuropneumoniae*.

- Byly připraveny expresní vektory pro produkci jednotlivých rekombinantních proteinů (rApfA-C-His, N-His-rApxIA-C-His, N-His-rApxIIA-C-His, N-His-rApxIIIA-C-His, N-His-rApxIVA-C-His, N-His-rTbpB-C-His).
- Z uvedených expresních vektorů byly produkovány a purifikovány rekombinantní proteiny.
- **PŘÍPRAVA MYŠÍCH HYPERIMUNNÍCH SÉR, ZAVEDENÍ A OPTIMALIZACE ELISA METODY PRO SPECIFICKOU DETEKCI HLADIN SÉROVÝCH PROTILÁTEK PROTI JEDNOTLIVÝM REKOMBINANTNÍM ANTIGENŮM RAPXIA, RAPXIIA A RAPXIIIA**
 - Provedenou vakcinací myší byla připravena sada hyperimunních sér. Za použití těchto sér byla zavedena metoda ELISA pro specifickou detekci protilátek proti jednotlivým antigenům. Tato metoda byla optimalizována úpravou množství každého z antigenů navázaného na mikrotitrační destičku. Uvedená optimalizace umožnila vysoce specifické rozlišení protilátek proti jinak vysoce homologním proteinům rApxIA, rApxIIA a rApxIIIA.
- **STUDIUM IMUNOPROTEKTIVNÍCH ÚČINKŮ PŘIPRAVENÝCH REKOMBINANTNÍCH ANTIGENŮ V IMUNOPROFYLAXI PRASAT PROTI AKTINOBACILOVÉ PLEUROPNEUMonii**
 - Bylo zavedeno imunizační schéma pro imunizace prasat jednotlivými rekombinantními antigeny a jejich kombinacemi.
 - Na základě provedené detekce hladin sérových protilátek proti jednotlivým rekombinantním antigenům v různých předem specifikovaných bodech imunizačního schématu bylo toto schéma optimalizováno tak, aby byly hladiny protektivních protilátek po imunizaci co možná nejvyšší.
 - Infekční dávka *A. pleuropneumoniae* sérotyp 9 byla stanovena jako LD₅₀ a činila 2×10^8 CFU.
 - Po imunizaci byla provedena experimentální intranasální infekce (čelenž) prasat 50% infekční dávkou *A. pleuropneumoniae* s následným sledováním klinických projevů pleuropneumonie u jednotlivých vakcinovaných skupin.

- Byly vyhodnoceny výsledky opakované experimentální infekce a na jejich základě byla stanovena účinnost jednotlivých vakcín.
- Jako nejúčinnější z testovaných vakcín se ukázala vakcína složená z šesti podjednotek (rApxIA, rApxIIA, rApxIIIA, rApxIVA, rTbpB a rApfA).

9 LITERATURA

1. **Abraham, S. N., Jonsson, A. B. & Normark, S. (1998).** Fimbriae-mediated host-pathogen cross-talk. *Curr Opin Microbiol* **1**, 75-81.
2. **Achtman, M., Neibert, M., Crowe, B. A. & other authors (1988).** Purification and characterization of eight class 5 outer membrane protein variants from a clone of *Neisseria meningitidis* serogroup A. *J Exp Med* **168**, 507-525.
3. **Ajito, T., Haga, Y., Homma, S., Goryo, M. & Okada, K. (1996).** Immunohistological evaluation on respiratory lesions of pigs intranasally inoculated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *J Vet Med Sci* **58**, 297-303.
4. **Alm, R. A. & Mattick, J. S. (1997).** Genes involved in the biogenesis and function of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **192**, 89-98.
5. **Alteri, C. J., Xicohtencatl-Cortes, J., Hess, S., Caballero-Olin, G., Giron, J. A. & Friedman, R. L. (2007).** *Mycobacterium tuberculosis* produces pili during human infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5145-5150.
6. **Anderson, E. L., Bowers, T., Mink, C. M., Kennedy, D. J., Belshe, R. B., Harakeh, H., Pais, L., Holder, P. & Carlone, G. M. (1994).** Safety and immunogenicity of meningococcal A and C polysaccharide conjugate vaccine in adults. *Infect Immun* **62**, 3391-3395.
7. **Bairoch, A. & Apweiler, R. (2000).** The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Res* **28**, 45-48.
8. **Bakas, L., Ostolaza, H., Vaz, W. L. & Goni, F. M. (1996).** Reversible adsorption and nonreversible insertion of *Escherichia coli* alpha-hemolysin into lipid bilayers. *Biophys J* **71**, 1869-1876.
9. **Balashova, N. V., Shah, C., Patel, J. K., Megalla, S. & Kachlany, S. C. (2009).** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* LtxC is required for leukotoxin activity and initial interaction between toxin and host cells. *Gene* **443**, 42-47.
10. **Basler, M., Masin, J., Osicka, R. & Sebo, P. (2006).** Pore-forming and enzymatic activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin synergize in promoting lysis of monocytes. *Infect Immun* **74**, 2207-2214.
11. **Basler, M., Knapp, O., Masin, J., Fiser, R., Maier, E., Benz, R., Sebo, P. & Osicka, R. (2007).** Segments crucial for membrane translocation and pore-forming activity of *Bordetella adenylate* cyclase toxin. *J Biol Chem* **282**, 12419-12429.
12. **Bauer, M. E. & Welch, R. A. (1996a).** Association of RTX toxins with erythrocytes. *Infect Immun* **64**, 4665-4672.

13. **Bauer, M. E. & Welch, R. A. (1996b).** Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **64**, 167-175.
14. **Baumann, U., Wu, S., Flaherty, K. M. & McKay, D. B. (1993).** Three-dimensional structure of the alkaline protease of *Pseudomonas aeruginosa*: a two-domain protein with a calcium binding parallel beta roll motif. *EMBO J* **12**, 3357-3364.
15. **Beard, M. K., Mattick, J. S., Moore, L. J., Mott, M. R., Marrs, C. F. & Egerton, J. R. (1990).** Morphogenetic expression of *Moraxella bovis* fimbriae (pili) in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **172**, 2601-2607.
16. **Bei, W., He, Q., Zhou, R., Yan, L., Huang, H. & Chen, H. (2007).** Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of *Actinobacillus pleuropneumoniae* HB04C(-) mutant lacking a drug resistance marker in the pigs. *Vet Microbiol* **125**, 120-127.
17. **Bellalou, J., Ladant, D. & Sakamoto, H. (1990).** Synthesis and secretion of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase as a 200-kDa protein. *Infect Immun* **58**, 1195-1200.
18. **Benz, R., Schmid, A., Wagner, W. & Goebel, W. (1989).** Pore formation by the *Escherichia coli* hemolysin: evidence for an association-dissociation equilibrium of the pore-forming aggregates. *Infect Immun* **57**, 887-895.
19. **Benz, R., Maier, E., Ladant, D., Ullmann, A. & Sebo, P. (1994).** Adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**, 27231-27239.
20. **Bergsten, G., Wullt, B., Schembri, M. A., Leijonhufvud, I. & Svanborg, C. (2007).** Do type 1 fimbriae promote inflammation in the human urinary tract? *Cell Microbiol* **9**, 1766-1781.
21. **Bertram, T. A. (1985).** Quantitative morphology of peracute pulmonary lesions in swine induced by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Vet Pathol* **22**, 598-609.
22. **Bhakdi, S. & Tranum-Jensen, J. (1986).** Membrane damage by pore-forming bacterial cytolysins. *Microb Pathog* **1**, 5-14.
23. **Bhakdi, S., Greulich, S., Muhly, M., Eberspacher, B., Becker, H., Thiele, A. & Hugo, F. (1989).** Potent leukocidal action of *Escherichia coli* hemolysin mediated by permeabilization of target cell membranes. *J Exp Med* **169**, 737-754.
24. **Bian, Z., Brauner, A., Li, Y. & Normark, S. (2000).** Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. *J Infect Dis* **181**, 602-612.
25. **Birkness, K. A., Swisher, B. L., White, E. H., Long, E. G., Ewing, E. P., Jr. & Quinn, F. D. (1995).** A tissue culture bilayer model to study the passage of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **63**, 402-409.
26. **Blackall, P. J., Klaasen, H. L., van den Bosch, H., Kuhnert, P. & Frey, J. (2002).** Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet Microbiol* **84**, 47-52.

27. **Blanton, K. J., Biswas, G. D., Tsai, J., Adams, J., Dyer, D. W., Davis, S. M., Koch, G. G., Sen, P. K. & Sparling, P. F. (1990).** Genetic evidence that *Neisseria gonorrhoeae* produces specific receptors for transferrin and lactoferrin. *J Bacteriol* **172**, 5225-5235.
28. **Boekema, B. K., Kamp, E. M., Smits, M. A., Smith, H. E. & Stockhofe-Zurwieden, N. (2004a).** Both ApxI and ApxII of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 are necessary for full virulence. *Vet Microbiol* **100**, 17-23.
29. **Boekema, B. K., Van Putten, J. P., Stockhofe-Zurwieden, N. & Smith, H. E. (2004b).** Host cell contact-induced transcription of the type IV fimbria gene cluster of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* **72**, 691-700.
30. **Boslego, J. W., Tramont, E. C., Chung, R. C. & other authors (1991).** Efficacy trial of a parenteral gonococcal pilus vaccine in men. *Vaccine* **9**, 154-162.
31. **Bosse, J. T., Janson, H., Sheehan, B. J., Beddek, A. J., Rycroft, A. N., Kroll, J. S. & Langford, P. R. (2002).** *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes Infect* **4**, 225-235.
32. **Bumba, L., Masin, J., Fiser, R. & Sebo, P. (2010).** Bordetella adenylate cyclase toxin mobilizes its beta2 integrin receptor into lipid rafts to accomplish translocation across target cell membrane in two steps. *PLoS Pathog* **6**, e1000901.
33. **Byrd, W., Harmon, B. G. & Kadis, S. (1992a).** Protective efficacy of conjugate vaccines against experimental challenge with porcine *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Immunol Immunopathol* **34**, 307-324.
34. **Byrd, W. & Kadis, S. (1992b).** Preparation, characterization, and immunogenicity of conjugate vaccines directed against *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence determinants. *Infect Immun* **60**, 3042-3051.
35. **Callaghan, M. J., Jolley, K. A. & Maiden, M. C. (2006).** Opacity-associated adhesin repertoire in hyperinvasive *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **74**, 5085-5094.
36. **Callaghan, M. J., Buckee, C., McCarthy, N. D. & other authors (2008a).** Opa protein repertoires of disease-causing and carried meningococci. *J Clin Microbiol* **46**, 3033-3041.
37. **Callaghan, M. J., Buckee, C. O., Jolley, K. A., Kriz, P., Maiden, M. C. & Gupta, S. (2008b).** The effect of immune selection on the structure of the meningococcal opa protein repertoire. *PLoS Pathog* **4**, e1000020.
38. **Cao, L., Yan, X., Borysenko, C. W., Blair, H. C., Wu, C. & Yu, L. (2005).** CHDL: a cadherin-like domain in *Proteobacteria* and *Cyanobacteria*. *FEMS Microbiol Lett* **251**, 203-209.
39. **Cavalieri, S. J. & Snyder, I. S. (1982).** Effect of *Escherichia coli* alpha-hemolysin on human peripheral leukocyte function in vitro. *Infect Immun* **37**, 966-974.

40. **Chamot-Rooke, J., Rousseau, B., Lanternier, F. & other authors (2007).** Alternative *Neisseria* spp. type IV pilin glycosylation with a glyceramido acetamido-trideoxyhexose residue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14783-14788.
41. **Chang, Y. F., Young, R. & Struck, D. K. (1989).** Cloning and characterization of a hemolysin gene from *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *DNA* **8**, 635-647.
42. **Chiers, K., van Overbeke, I., De Laender, P., Ducatelle, R., Carel, S. & Haesebrouck, F. (1998).** Effects of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with inactivated vaccines containing the Apx toxins. *Vet Q* **20**, 65-69.
43. **Chiers, K., Van Overbeke, I., Donne, E., Baele, M., Ducatelle, R., De Baere, T. & Haesebrouck, F. (2001).** Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in cultures from nasal and tonsillar swabs of pigs by a PCR assay based on the nucleotide sequence of a *dsbE*-like gene. *Vet Microbiol* **83**, 147-159.
44. **Cho, W. S. & Chae, C. (2001).** Expression of the apxIV gene in pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Comp Pathol* **125**, 34-40.
45. **Chong, P., Chan, N., Kandil, A., Tripet, B., James, O., Yang, Y. P., Shi, S. P. & Klein, M. (1997).** A strategy for rational design of fully synthetic glycopeptide conjugate vaccines. *Infect Immun* **65**, 4918-4925.
46. **Chu, Q., Lee, D. T., Tsao, S. W., Wang, X. & Wong, Y. C. (2007).** S-allylcysteine, a water-soluble garlic derivative, suppresses the growth of a human androgen-independent prostate cancer xenograft, CWR22R, under in vivo conditions. *BJU Int* **99**, 925-932.
47. **Ciabattini, A., Giomarelli, B., Parigi, R. & other authors (2008).** Intranasal immunization of mice with recombinant *Streptococcus gordonii* expressing NadA of *Neisseria meningitidis* induces systemic bactericidal antibodies and local IgA. *Vaccine* **26**, 4244-4250.
48. **Claus, H., Maiden, M. C., Maag, R., Frosch, M. & Vogel, U. (2002).** Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. *Microbiology* **148**, 1813-1819.
49. **Comanducci, M., Bambini, S., Caugant, D. A., Mora, M., Brunelli, B., Capecchi, B., Ciocchi, L., Rappuoli, R. & Pizza, M. (2004).** NadA diversity and carriage in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **72**, 4217-4223.
50. **Coote, J. G. (1992).** Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **8**, 137-161.
51. **Cornelissen, C. N., Biswas, G. D., Tsai, J., Paruchuri, D. K., Thompson, S. A. & Sparling, P. F. (1992).** Gonococcal transferrin-binding protein 1 is required for transferrin utilization and is homologous to TonB-dependent outer membrane receptors. *J Bacteriol* **174**, 5788-5797.

52. **Criss, A. K., Kline, K. A. & Seifert, H. S. (2005).** The frequency and rate of pilin antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* **58**, 510-519.
53. **Crosby, J. A. & Kachlany, S. C. (2007).** TdeA, a TolC-like protein required for toxin and drug export in *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *Gene* **388**, 83-92.
54. **Cruijssen, T., van Leengoed, L. A., Ham-Hoffies, M. & Verheijden, J. H. (1995a).** Convalescent pigs are protected completely against infection with a homologous *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain but incompletely against a heterologous-serotype strain. *Infect Immun* **63**, 2341-2343.
55. **Cruijssen, T., van Leengoed, L. A., Kamp, E. M., Bartelse, A., Korevaar, A. & Verheijden, J. H. (1995b).** Susceptibility to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs from an endemically infected herd is related to the presence of toxin-neutralizing antibodies. *Vet Microbiol* **47**, 219-228.
56. **Cruijssen, T. L., Van Leengoed, L. A., Dekker-Nooren, T. C., Schoevers, E. J. & Verheijden, J. H. (1992).** Phagocytosis and killing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes isolated from pigs. *Infect Immun* **60**, 4867-4871.
57. **Czuprynski, C. J. & Sample, A. K. (1990).** Interactions of *Haemophilus-Actinobacillus-Pasteurella* bacteria with phagocytic cells. *Can J Vet Res* **54 Suppl**, S36-40.
58. **de Vries, F. P., Cole, R., Dankert, J., Frosch, M. & van Putten, J. P. (1998).** *Neisseria meningitidis* producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors. *Mol Microbiol* **27**, 1203-1212.
59. **Devenish, J., Rosendal, S., Bosse, J. T., Wilkie, B. N. & Johnson, R. (1990).** Prevalence of seroreactors to the 104-kDa hemolysin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in swine herds. *J Clin Microbiol* **28**, 789-791.
60. **Dinh, T., Paulsen, I. T. & Saier, M. H., Jr. (1994).** A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **176**, 3825-3831.
61. **Dobson, S. R., Kroll, J. S. & Moxon, E. R. (1992).** Insertion sequence IS1016 and absence of *Haemophilus* capsulation genes in the Brazilian purpuric fever clone of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius. *Infect Immun* **60**, 618-622.
62. **Dolan-Livengood, J. M., Miller, Y. K., Martin, L. E., Urwin, R. & Stephens, D. S. (2003).** Genetic basis for nongroupable *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis* **187**, 1616-1628.
63. **Dom, P., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. & Charlier, G. (1994a).** In vivo association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 with the respiratory epithelium of pigs. *Infect Immun* **62**, 1262-1267.

64. **Dom, P., Haesebrouck, F., Kamp, E. M. & Smits, M. A. (1994b).** NAD-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains: production of RTX toxins and interactions with porcine phagocytes. *Vet Microbiol* **39**, 205-218.
65. **Donnenberg, M. S. (2000).** Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature* **406**, 768-774.
66. **Doughty, S. W., Ruffolo, C. G. & Adler, B. (2000).** The type 4 fimbrial subunit gene of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* **72**, 79-90.
67. **Eberspacher, B., Hugo, F. & Bhakdi, S. (1989).** Quantitative study of the binding and hemolytic efficiency of *Escherichia coli* hemolysin. *Infect Immun* **57**, 983-988.
68. **El-Azami-El-Idrissi, M., Bauche, C., Loucka, J., Osicka, R., Sebo, P., Ladant, D. & Leclerc, C. (2003).** Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *J Biol Chem* **278**, 38514-38521.
69. **Elleman, T. C., Hoyne, P. A., Emery, D. L., Stewart, D. J. & Clark, B. L. (1984).** Isolation of the gene encoding pilin of *Bacteroides nodosus* (strain 198), the causal organism of ovine footrot. *FEBS Lett* **173**, 103-107.
70. **Estabrook, M. M., Jack, D. L., Klein, N. J. & Jarvis, G. A. (2004).** Mannose-binding lectin binds to two major outer membrane proteins, opacity protein and porin, of *Neisseria meningitidis*. *J Immunol* **172**, 3784-3792.
71. **Fiser, R., Masin, J., Basler, M., Krusek, J., Spulakova, V., Konopasek, I. & Sebo, P. (2007).** Third activity of *Bordetella* adenylate cyclase (AC) toxin-hemolysin. Membrane translocation of AC domain polypeptide promotes calcium influx into CD11b+ monocytes independently of the catalytic and hemolytic activities. *J Biol Chem* **282**, 2808-2820.
72. **Fiser, R. & Konopasek, I. (2009).** Different modes of membrane permeabilization by two RTX toxins: HlyA from *Escherichia coli* and CyaA from *Bordetella pertussis*. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 1249-1254.
73. **Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O. & other authors (1995).** Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**, 496-512.
74. **Foote, S. J., Bosse, J. T., Bouevitch, A. B., Langford, P. R., Young, N. M. & Nash, J. H. (2008).** The complete genome sequence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* L20 (serotype 5b). *J Bacteriol* **190**, 1495-1496.
75. **Forestier, C. & Welch, R. A. (1991).** Identification of RTX toxin target cell specificity domains by use of hybrid genes. *Infect Immun* **59**, 4212-4220.
76. **Frey, J., Deillon, J. B., Gygi, D. & Nicolet, J. (1991a).** Identification and partial characterization of the hemolysin (HlyII) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2. *Vet Microbiol* **28**, 303-312.

77. **Frey, J., Meier, R., Gygi, D. & Nicolet, J. (1991b).** Nucleotide sequence of the hemolysin I gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* **59**, 3026-3032.
78. **Frey, J. & Nicolet, J. (1991c).** Immunological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin I. *Vet Microbiol* **28**, 61-73.
79. **Frey, J., Beck, M., Stucki, U. & Nicolet, J. (1993a).** Analysis of hemolysin operons in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene* **123**, 51-58.
80. **Frey, J., Bosse, J. T., Chang, Y. F. & other authors (1993b).** *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolysins, pleurotoxin and their genes. *J Gen Microbiol* **139**, 1723-1728.
81. **Frey, J., Haldimann, A., Nicolet, J., Boffini, A. & Prentki, P. (1994).** Sequence analysis and transcription of the apxI operon (hemolysin I) from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene* **142**, 97-102.
82. **Frey, J. (1995).** Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol* **3**, 257-261.
83. **Frey, J. & Kuhnert, P. (2002).** RTX toxins in *Pasteurellaceae*. *Int J Med Microbiol* **292**, 149-158.
84. **Fullner, K. J. & Mekalanos, J. J. (2000).** *In vivo* covalent cross-linking of cellular actin by the *Vibrio cholerae* RTX toxin. *EMBO J* **19**, 5315-5323.
85. **Gadeberg, O. V. & Orskov, I. (1984).** *In vitro* cytotoxic effect of alpha-hemolytic *Escherichia coli* on human blood granulocytes. *Infect Immun* **45**, 255-260.
86. **Gangola, P. & Rosen, B. P. (1987).** Maintenance of intracellular calcium in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **262**, 12570-12574.
87. **Genco, C. A. & Desai, P. J. (1996).** Iron acquisition in the pathogenic *Neisseria*. *Trends Microbiol* **4**, 179-184.
88. **Gentschev, I. & Goebel, W. (1992).** Topological and functional studies on HlyB of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **232**, 40-48.
89. **Gerlach, G. F., Anderson, C., Potter, A. A., Klashinsky, S. & Willson, P. J. (1992).** Cloning and expression of a transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* **60**, 892-898.
90. **Gilsdorf, J. R., McCrea, K. W. & Marrs, C. F. (1997).** Role of pili in *Haemophilus influenzae* adherence and colonization. *Infect Immun* **65**, 2997-3002.
91. **Gonzalez, G. C., Caamano, D. L. & Schryvers, A. B. (1990).** Identification and characterization of a porcine-specific transferrin receptor in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Mol Microbiol* **4**, 1173-1179.

92. **Gray-Owen, S. D. & Schryvers, A. B. (1995).** Characterization of transferrin binding proteins 1 and 2 in invasive type b and nontypeable strains of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **63**, 3809-3815.
93. **Grifantini, R., Sebastian, S., Frigimelica, E., Draghi, M., Bartolini, E., Muzzi, A., Rappuoli, R., Grandi, G. & Genco, C. A. (2003).** Identification of iron-activated and -repressed Fur-dependent genes by transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* group B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9542-9547.
94. **Griffiss, J. M. (1982).** Epidemic meningococcal disease: synthesis of a hypothetical immunoepidemiologic model. *Rev Infect Dis* **4**, 159-172.
95. **Griffiths, N. J., Bradley, C. J., Heyderman, R. S. & Virji, M. (2007).** IFN-gamma amplifies NFkappaB-dependent *Neisseria meningitidis* invasion of epithelial cells via specific upregulation of CEA-related cell adhesion molecule 1. *Cell Microbiol* **9**, 2968-2983.
96. **Groves, J. T. (1997).** Artificial enzymes. The importance of being selective. *Nature* **389**, 329-330.
97. **Guermonprez, P., Khelef, N., Blouin, E., Rieu, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Guiso, N., Ladant, D. & Leclerc, C. (2001).** The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *J Exp Med* **193**, 1035-1044.
98. **Haesebrouck, F., Chiers, K., Van Overbeke, I. & Ducatelle, R. (1997).** *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Vet Microbiol* **58**, 239-249.
99. **Haesebrouck, F., Pasmans, F., Chiers, K., Maes, D., Ducatelle, R. & Decostere, A. (2004).** Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Vet Microbiol* **100**, 255-268.
100. **Haga, Y., Ogino, S., Ohashi, S., Ajito, T., Hashimoto, K. & Sawada, T. (1997).** Protective efficacy of an affinity-purified hemolysin vaccine against experimental swine pleuropneumonia. *J Vet Med Sci* **59**, 115-120.
101. **Hagblom, P., Segal, E., Billyard, E. & So, M. (1985).** Intragenic recombination leads to pilus antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*. *Nature* **315**, 156-158.
102. **Hewlett, E. L., Gray, L., Allietta, M., Ehrmann, I., Gordon, V. M. & Gray, M. C. (1991).** Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. Conformational change associated with toxin activity. *J Biol Chem* **266**, 17503-17508.
103. **Hewlett, E. L., Donato, G. M. & Gray, M. C. (2006).** Macrophage cytotoxicity produced by adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*: more than just making cyclic AMP! *Mol Microbiol* **59**, 447-459.
104. **Higgins, C. F. (1992).** ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**, 67-113.

105. **Highlander, S. K., Fedorova, N. D., Dusek, D. M., Panciera, R., Alvarez, L. E. & Rinehart, C. (2000).** Inactivation of *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin causes partial attenuation of virulence in a calf challenge model. *Infect Immun* **68**, 3916-3922.
106. **Hobbs, M. M., Malorny, B., Prasad, P., Morelli, G., Kusecek, B., Heckels, J. E., Cannon, J. G. & Achtman, M. (1998).** Recombinational reassortment among opa genes from ET-37 complex *Neisseria meningitidis* isolates of diverse geographical origins. *Microbiology* **144** (Pt 1), 157-166.
107. **Hoefling, D. C. (1991).** Acute myositis associated with *Hemophilus parasuis* in primary SPF sows. *J Vet Diagn Invest* **3**, 354-355.
108. **Hoefling, D. C. (1998).** Tracking the incidence of porcine respiratory diseases. **April**, 391-398.
109. **Holland, I. B. & Blight, M. A. (1999).** ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol* **293**, 381-399.
110. **Holland, K. A. & Holland, I. B. (2005).** Adventures with ABC-proteins: highly conserved ATP-dependent transporters. *Acta Microbiol Immunol Hung* **52**, 309-322.
111. **Huang, S. H., Stins, M. F. & Kim, K. S. (2000).** Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis. *Microbes Infect* **2**, 1237-1244.
112. **Irwin, S. W., Averil, N., Cheng, C. Y. & Schryvers, A. B. (1993).** Preparation and analysis of isogenic mutants in the transferrin receptor protein genes, *tbpA* and *tbpB*, from *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **8**, 1125-1133.
113. **Iwaki, M., Ullmann, A. & Sebo, P. (1995).** Identification by in vitro complementation of regions required for cell-invasive activity of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Mol Microbiol* **17**, 1015-1024.
114. **Iwase, M., Lally, E. T., Berthold, P., Korchak, H. M. & Taichman, N. S. (1990).** Effects of cations and osmotic protectants on cytolytic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect Immun* **58**, 1782-1788.
115. **Jackson, L. A., Ducey, T. F., Day, M. W., Zaitshik, J. B., Orvis, J. & Dyer, D. W. (2010).** Transcriptional and functional analysis of the *Neisseria gonorrhoeae* Fur regulon. *J Bacteriol* **192**, 77-85.
116. **Jacques, M., Foiry, B., Higgins, R. & Mittal, K. R. (1988).** Electron microscopic examination of capsular material from various serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Bacteriol* **170**, 3314-3318.
117. **Jacques, M., Belanger, M., Roy, G. & Foiry, B. (1991).** Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal epithelial cells and frozen lung sections. *Vet Microbiol* **27**, 133-143.

118. **Jansen, R., Briaire, J., van Geel, A. B., Kamp, E. M., Gielkens, A. L. & Smits, M. A. (1994).** Genetic map of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxin (Apx) operons: characterization of the ApxIII operons. *Infect Immun* **62**, 4411-4418.
119. **Jeannotte, M. E., Abul-Milh, M., Dubreuil, J. D. & Jacques, M. (2003).** Binding of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to phosphatidylethanolamine. *Infect Immun* **71**, 4657-4663.
120. **Jensen, A. E. & Bertram, T. A. (1986).** Morphological and biochemical comparison of virulent and avirulent isolates of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect Immun* **51**, 419-424.
121. **Jeong, H., Yim, J. H., Lee, C. & other authors (2005).** Genomic BlueBlueprint of *Hahella chejuensis*, a marine microbe producing an algicidal agent. *Nucleic Acids Res* **33**, 7066-7073.
122. **Jobert, J. L., Savoye, C., Cariolet, R., Kobisch, M. & Madec, F. (2000).** Experimental aerosol transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to pigs. *Can J Vet Res* **64**, 21-26.
123. **Join-Lambert, O., Morand, P. C., Carbonnelle, E., Coureuil, M., Bille, E., Bourdoulous, S. & Nassif, X. (2010).** Mechanisms of meningeal invasion by a bacterial extracellular pathogen, the example of *Neisseria meningitidis*. *Prog Neurobiol* **91**, 130-139.
124. **Jones, C., Virji, M. & Crocker, P. R. (2003).** Recognition of sialylated meningococcal lipopolysaccharide by siglecs expressed on myeloid cells leads to enhanced bacterial uptake. *Mol Microbiol* **49**, 1213-1225.
125. **Kachlany, S. C., Planet, P. J., Desalle, R., Fine, D. H., Figurski, D. H. & Kaplan, J. B. (2001).** flp-1, the first representative of a new pilin gene subfamily, is required for non-specific adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Mol Microbiol* **40**, 542-554.
126. **Kallstrom, H., Liszewski, M. K., Atkinson, J. P. & Jonsson, A. B. (1997).** Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* **25**, 639-647.
127. **Kamp, E. M., Vermeulen, T. M., Smits, M. A. & Haagsma, J. (1994).** Production of Apx toxins by field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus suis*. *Infect Immun* **62**, 4063-4065.
128. **Kaneko, T., Nakajima, N., Okamoto, S. & other authors (2007).** Complete genomic structure of the bloom-forming toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-843. *DNA Res* **14**, 247-256.
129. **Kawula, T. H., Aho, E. L., Barritt, D. S., Klapper, D. G. & Cannon, J. G. (1988).** Reversible phase variation of expression of *Neisseria meningitidis* class 5 outer membrane proteins and their relationship to gonococcal proteins II. *Infect Immun* **56**, 380-386.
130. **Keane, W. F., Welch, R., Gekker, G. & Peterson, P. K. (1987).** Mechanism of *Escherichia coli* alpha-hemolysin-induced injury to isolated renal tubular cells. *Am J Pathol* **126**, 350-357.

131. **Kenny, B., Haigh, R. & Holland, I. B. (1991).** Analysis of the haemolysin transport process through the secretion from *Escherichia coli* of PCM, CAT or beta-galactosidase fused to the Hly C-terminal signal domain. *Mol Microbiol* **5**, 2557-2568.
132. **Kenri, T., Seto, S., Horino, A., Sasaki, Y., Sasaki, T. & Miyata, M. (2004).** Use of fluorescent-protein tagging to determine the subcellular localization of *Mycoplasma pneumoniae* proteins encoded by the cytoadherence regulatory locus. *J Bacteriol* **186**, 6944-6955.
133. **Kimmel, S. R. (2002).** Vaccine adverse events: separating myth from reality. *Am Fam Physician* **66**, 2113-2120.
134. **Klein, N. J., Ison, C. A., Peakman, M., Levin, M., Hammerschmidt, S., Frosch, M. & Heyderman, R. S. (1996).** The influence of capsulation and lipooligosaccharide structure on neutrophil adhesion molecule expression and endothelial injury by *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis* **173**, 172-179.
135. **Koronakis, V., Andersen, C. & Hughes, C. (2001).** Channel-tunnels. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 403-407.
136. **Kriz, P., Vlckova, J. & Bobak, M. (1995).** Targeted vaccination with meningococcal polysaccharide vaccine in one district of the Czech Republic. *Epidemiol Infect* **115**, 411-418.
137. **Kubiet, M., Ramphal, R., Weber, A. & Smith, A. (2000).** Pilus-mediated adherence of *Haemophilus influenzae* to human respiratory mucins. *Infect Immun* **68**, 3362-3367.
138. **Kucerova, J. R., Ondriasova R., Nedbalcova K. (2005).** Serotype distribution of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Czech republic during period 2003-2004. *Veterinary Medicine-Czech*, 355-360.
139. **Lally, E. T., Hill, R. B., Kieba, I. R. & Korostoff, J. (1999).** The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol* **7**, 356-361.
140. **Lappann, M., Haagensen, J. A., Claus, H., Vogel, U. & Molin, S. (2006).** Meningococcal biofilm formation: structure, development and phenotypes in a standardized continuous flow system. *Mol Microbiol* **62**, 1292-1309.
141. **Lear, J. D., Furblur, U. G., Lally, E. T. & Tanaka, J. C. (1995).** *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin forms large conductance, voltage-gated ion channels when incorporated into planar lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* **1238**, 34-41.
142. **Lee, S. W., Bonnah, R. A., Higashi, D. L., Atkinson, J. P., Milgram, S. L. & So, M. (2002).** CD46 is phosphorylated at tyrosine 354 upon infection of epithelial cells by *Neisseria gonorrhoeae*. *J Cell Biol* **156**, 951-957.
143. **Lee, S. W., Higashi, D. L., Snyder, A., Merz, A. J., Potter, L. & So, M. (2005).** PilT is required for PI(3,4,5)P₃-mediated crosstalk between *Neisseria gonorrhoeae* and epithelial cells. *Cell Microbiol* **7**, 1271-1284.

144. **Legrain, M., Mazarin, V., Irwin, S. W., Bouchon, B., Quentin-Millet, M. J., Jacobs, E. & Schryvers, A. B. (1993).** Cloning and characterization of *Neisseria meningitidis* genes encoding the transferrin-binding proteins Tbp1 and Tbp2. *Gene* **130**, 73-80.
145. **Lei, L., Sun, C., Lu, S., Feng, X., Wang, J. & Han, W. (2008).** Selection of serotype-specific vaccine candidate genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and heterologous immunization with *Propionibacterium acnes*. *Vaccine* **26**, 6274-6280.
146. **Leininger, E., Roberts, M., Kenimer, J. G., Charles, I. G., Fairweather, N., Novotny, P. & Brennan, M. J. (1991).** Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 345-349.
147. **Leong, J. M., Morrissey, P. E., Marra, A. & Isberg, R. R. (1995).** An aspartate residue of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein that is critical for integrin binding. *EMBO J* **14**, 422-431.
148. **Lepper, A. W., Moore, L. J., Atwell, J. L. & Tennent, J. M. (1992).** The protective efficacy of pili from different strains of *Moraxella bovis* within the same serogroup against infectious bovine keratoconjunctivitis. *Vet Microbiol* **32**, 177-187.
149. **Liggett, A. D., Harrison, L. R. & Farrell, R. L. (1987).** Sequential study of lesion development in experimental haemophilus pleuropneumonia. *Res Vet Sci* **42**, 204-212.
150. **Lin, L., Bei, W., Sha, Y., Liu, J., Guo, Y., Liu, W., Tu, S., He, Q. & Chen, H. (2007).** Construction and immunogenicity of a DeltaapxIC/DeltaapxIIC double mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 1. *FEMS Microbiol Lett* **274**, 55-62.
151. **Linhartova, I., Bumba, L., Masin, J. & other authors (2010).** RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol Rev* **34**, 1076-1112.
152. **Litt, D. J., Palmer, H. M. & Borriello, S. P. (2000).** *Neisseria meningitidis* expressing transferrin binding proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* can utilize porcine transferrin for growth. *Infect Immun* **68**, 550-557.
153. **Liu, J., Chen, X., Lin, L. & other authors (2007).** Potential use an *Actinobacillus pleuropneumoniae* double mutant strain DeltaapxIICDeltaapxIVA as live vaccine that allows serological differentiation between vaccinated and infected animals. *Vaccine* **25**, 7696-7705.
154. **Liu, J., Chen, X., Tan, C., Guo, Y., Chen, Y., Fu, S., Bei, W. & Chen, H. (2009).** In vivo induced RTX toxin ApxIVA is essential for the full virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* **137**, 282-289.
155. **Ludwig, A., Jarchau, T., Benz, R. & Goebel, W. (1988).** The repeat domain of *Escherichia coli* haemolysin (HlyA) is responsible for its Ca²⁺-dependent binding to erythrocytes. *Mol Gen Genet* **214**, 553-561.

156. **Ludwig, A., Benz, R. & Goebel, W. (1993).** Oligomerization of *Escherichia coli* haemolysin (HlyA) is involved in pore formation. *Mol Gen Genet* **241**, 89-96.
157. **Ludwig, A., Garcia, F., Bauer, S., Jarchau, T., Benz, R., Hoppe, J. & Goebel, W. (1996).** Analysis of the in vivo activation of hemolysin (HlyA) from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**, 5422-5430.
158. **Maas, A., Jacobsen, I. D., Meens, J. & Gerlach, G. F. (2006).** Use of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* multiple mutant as a vaccine that allows differentiation of vaccinated and infected animals. *Infect Immun* **74**, 4124-4132.
159. **Maier, E., Reinhard, N., Benz, R. & Frey, J. (1996).** Channel-forming activity and channel size of the RTX toxins ApxI, ApxII, and ApxIII of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* **64**, 4415-4423.
160. **Mao, H. (2004).** A self-cleavable sortase fusion for one-step purification of free recombinant proteins. *Protein Expr Purif* **37**, 253-263.
161. **Marchesini, M. I., Ugalde, J. E., Czibener, C., Commerci, D. J. & Ugalde, R. A. (2004).** N-terminal-capturing screening system for the isolation of *Brucella abortus* genes encoding surface exposed and secreted proteins. *Microb Pathog* **37**, 95-105.
162. **Masin, J., Basler, M., Knapp, O., El-Azami-El-Idrissi, M., Maier, E., Konopasek, I., Benz, R., Leclerc, C. & Sebo, P. (2005).** Acylation of lysine 860 allows tight binding and cytotoxicity of *Bordetella adenylate* cyclase on CD11b-expressing cells. *Biochemistry* **44**, 12759-12766.
163. **Menestrina, G., Mackman, N., Holland, I. B. & Bhakdi, S. (1987).** *Escherichia coli* haemolysin forms voltage-dependent ion channels in lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **905**, 109-117.
164. **Menestrina, G., Schiavo, G. & Montecucco, C. (1994).** Molecular mechanisms of action of bacterial protein toxins. *Mol Aspects Med* **15**, 79-193.
165. **Menestrina, G., Pederzoli, C., Dalla Serra, M., Bregante, M. & Gambale, F. (1996).** Permeability increase induced by *Escherichia coli* hemolysin A in human macrophages is due to the formation of ionic pores: a patch clamp characterization. *J Membr Biol* **149**, 113-121.
166. **Mercier, J. C., Beaufils, F., Hartmann, J. F. & Azema, D. (1988).** Hemodynamic patterns of meningococcal shock in children. *Crit Care Med* **16**, 27-33.
167. **Merz, A. J. & So, M. (2000).** Interactions of pathogenic neisseriae with epithelial cell membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 423-457.
168. **Mickelsen, P. A., Blackman, E. & Sparling, P. F. (1982).** Ability of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, and commensal *Neisseria* species to obtain iron from lactoferrin. *Infect Immun* **35**, 915-920.

169. **Min, K. & Chae, C. (1998).** Detection and distribution of DNA of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the lungs of naturally infected pigs by *in-situ* hybridization. *J Comp Pathol* **119**, 169-175.
170. **Mittal, K. R., Kamp, E. M. & Kobisch, M. (1993).** Serological characterisation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 1, 9 and 11. *Res Vet Sci* **55**, 179-184.
171. **Moayeri, M. & Welch, R. A. (1997).** Prelytic and lytic conformations of erythrocyte-associated *Escherichia coli* hemolysin. *Infect Immun* **65**, 2233-2239.
172. **Mobley, H. L., Green, D. M., Trifillis, A. L., Johnson, D. E., Chippendale, G. R., Lockatell, C. V., Jones, B. D. & Warren, J. W. (1990).** Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infect Immun* **58**, 1281-1289.
173. **Mola, N. L. S., Weisse M. E. (2008).** Treatment and Prevention of *Neisseria meningitidis* infection. *Infections in Medicine* **25**, 128-133.
174. **Moore, J., Bailey, S. E., Benmechernene, Z., Tzitzilonis, C., Griffiths, N. J., Virji, M. & Derrick, J. P. (2005).** Recognition of saccharides by the OpcA, OpaD, and OpaB outer membrane proteins from *Neisseria meningitidis*. *J Biol Chem* **280**, 31489-31497.
175. **Morova, J., Osicka, R., Masin, J. & Sebo, P. (2008).** RTX cytotoxins recognize beta2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5355-5360.
176. **Muller, D., Hughes, C. & Goebel, W. (1983).** Relationship between plasmid and chromosomal hemolysin determinants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **153**, 846-851.
177. **Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R. & Saravia, N. G. (2005).** Advances in leishmaniasis. *Lancet* **366**, 1561-1577.
178. **Nassif, X., Beretti, J. L., Lowy, J., Stenberg, P., O'Gaora, P., Pfeifer, J., Normark, S. & So, M. (1994).** Roles of pilin and PilC in adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3769-3773.
179. **Nassif, X., Marceau, M., Pujol, C., Pron, B., Beretti, J. L. & Taha, M. K. (1997).** Type-4 pili and meningococcal adhesiveness. *Gene* **192**, 149-153.
180. **Nassif, X. (2002).** [Pathophysiology of cerebrospinal meningitis]. *Ann Med Interne (Paris)* **153**, 318-322.
181. **Nicolet, L. A. D., Straw B.E., Mengeling W.L., D'Allaire S., Taylor D.J. (1992).** *Diseases of Swine*, 7 ed. Ames: Iowa State University Press.
182. **Nielsen, R. (1984).** *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes-cross protection experiments. *Nord Vet Med* **36**, 221-234.
183. **Norton, P. A. & Coffin, J. M. (1985).** Bacterial beta-galactosidase as a marker of Rous sarcoma virus gene expression and replication. *Mol Cell Biol* **5**, 281-290.

184. **Ogunnariwo, J. A., Alcantara, J. & Schryvers, A. B. (1991).** Evidence for non-siderophore-mediated acquisition of transferrin-bound iron by *Pasteurella multocida*. *Microb Pathog* **11**, 47-56.
185. **Oldfield, N. J., Donovan, E. A., Worrall, K. E., Wooldridge, K. G., Langford, P. R., Rycroft, A. N. & Ala'Aldeen, D. A. (2008).** Identification and characterization of novel antigenic vaccine candidates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vaccine* **26**, 1942-1954.
186. **Olyhoek, A. J., Sarkari, J., Bopp, M., Morelli, G. & Achtman, M. (1991).** Cloning and expression in *Escherichia coli* of *opc*, the gene for an unusual class 5 outer membrane protein from *Neisseria meningitidis* (meningococci/surface antigen). *Microb Pathog* **11**, 249-257.
187. **Osicka, R., Kalmusova, J., Krizova, P. & Sebo, P. (2001).** *Neisseria meningitidis* RTX protein FrpC induces high levels of serum antibodies during invasive disease: polymorphism of *frpC* alleles and purification of recombinant FrpC. *Infect Immun* **69**, 5509-5519.
188. **Osicka, R., Prochazkova, K., Sulc, M., Linhartova, I., Havlicek, V. & Sebo, P. (2004).** A novel "clip-and-link" activity of repeat in toxin (RTX) proteins from gram-negative pathogens. Covalent protein cross-linking by an Asp-Lys isopeptide bond upon calcium-dependent processing at an Asp-Pro bond. *J Biol Chem* **279**, 24944-24956.
189. **Osickova, A., Osicka, R., Maier, E., Benz, R. & Sebo, P. (1999).** An amphipathic alpha-helix including glutamates 509 and 516 is crucial for membrane translocation of adenylate cyclase toxin and modulates formation and cation selectivity of its membrane channels. *J Biol Chem* **274**, 37644-37650.
190. **Osickova, A., Masin, J., Fayolle, C., Krusek, J., Basler, M., Pospisilova, E., Leclerc, C., Osicka, R. & Sebo, P. (2010).** Adenylate cyclase toxin translocates across target cell membrane without forming a pore. *Mol Microbiol* **75**, 1550-1562.
191. **Ostolaza, H., Soloaga, A. & Goni, F. M. (1995).** The binding of divalent cations to *Escherichia coli* alpha-haemolysin. *Eur J Biochem* **228**, 39-44.
192. **Ostolaza, H., Bakas, L. & Goni, F. M. (1997).** Balance of electrostatic and hydrophobic interactions in the lysis of model membranes by *E. coli* alpha-haemolysin. *J Membr Biol* **158**, 137-145.
193. **Otero, A. S., Yi, X. B., Gray, M. C., Szabo, G. & Hewlett, E. L. (1995).** Membrane depolarization prevents cell invasion by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J Biol Chem* **270**, 9695-9697.
194. **Otey, C. A. & Carpen, O. (2004).** Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton* **58**, 104-111.
195. **Panina, E. M., Mironov, A. A. & Gelfand, M. S. (2001).** Comparative analysis of FUR regulons in gamma-proteobacteria. *Nucleic Acids Res* **29**, 5195-5206.

196. **Parkhill, J., Achtman, M., James, K. D. & other authors (2000).** Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491. *Nature* **404**, 502-506.
197. **Parkhill, J., Dougan, G., James, K. D. & other authors (2001).** Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* **413**, 848-852.
198. **Patel, M. & Lee, C. K. (2005).** Polysaccharide vaccines for preventing serogroup A meningococcal meningitis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD001093.
199. **Perfumo, C. J., Rehbinder, C. & Karlsson, K. (1983).** Swine pleuropneumonia produced by *Haemophilus pleuropneumoniae*. III. An electron microscopic study. *Zentralbl Veterinarmed B* **30**, 678-684.
200. **Perry, M. B. (1990).** Structural analysis of the lipopolysaccharide of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype 10. *Biochem Cell Biol* **68**, 808-810.
201. **Pettersson, A., Klarenbeek, V., van Deurzen, J., Poolman, J. T. & Tommassen, J. (1994).** Molecular characterization of the structural gene for the lactoferrin receptor of the meningococcal strain H44/76. *Microb Pathog* **17**, 395-408.
202. **Piatek, R., Zalewska, B., Bury, K. & Kur, J. (2005).** The chaperone-usher pathway of bacterial adhesin biogenesis -- from molecular mechanism to strategies of anti-bacterial prevention and modern vaccine design. *Acta Biochim Pol* **52**, 639-646.
203. **Pong, A. & Bradley, J. S. (1999).** Bacterial meningitis and the newborn infant. *Infect Dis Clin North Am* **13**, 711-733, viii.
204. **Prince, S. M., Achtman, M. & Derrick, J. P. (2002).** Crystal structure of the OpcA integral membrane adhesin from *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3417-3421.
205. **Prochazkova, K., Osicka, R., Linhartova, I., Halada, P., Sulc, M. & Sebo, P. (2005).** The *Neisseria meningitidis* outer membrane lipoprotein FrpD binds the RTX protein FrpC. *J Biol Chem* **280**, 3251-3258.
206. **Quagliarello, V. & Scheld, W. M. (1992).** Bacterial meningitis: pathogenesis, pathophysiology, and progress. *N Engl J Med* **327**, 864-872.
207. **Ramjeet, M., Deslandes, V., Goure, J. & Jacques, M. (2008).** *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccines: from bacterins to new insights into vaccination strategies. *Anim Health Res Rev* **9**, 25-45.
208. **Rao, V. K., Krasan, G. P., Hendrixson, D. R., Dawid, S. & St Geme, J. W., 3rd (1999).** Molecular determinants of the pathogenesis of disease due to non-typable *Haemophilus influenzae*. *FEMS Microbiol Rev* **23**, 99-129.
209. **Rhodes, C. R., Gray, M. C., Watson, J. M., Muratore, T. L., Kim, S. B., Hewlett, E. L. & Grisham, C. M. (2001).** Structural consequences of divalent metal binding by the adenyl cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Arch Biochem Biophys* **395**, 169-176.

210. **Rogers, R. J., Eaves, L. E., Blackall, P. J. & Truman, K. F. (1990).** The comparative pathogenicity of four serovars of *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae*. *Aust Vet J* **67**, 9-12.
211. **Rose, T., Sebo, P., Bellalou, J. & Ladant, D. (1995).** Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J Biol Chem* **270**, 26370-26376.
212. **Rosendal, S. & Mitchell, W. R. (1983).** Epidemiology of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs: a survey of Ontario Pork Producers, 1981. *Can J Comp Med* **47**, 1-5.
213. **Rosendal, S., Boyd, D. A. & Gilbride, K. A. (1985).** Comparative virulence of porcine *Haemophilus bacteria*. *Can J Comp Med* **49**, 68-74.
214. **Rosenqvist, E., Hoiby, E. A., Wedege, E., Kusecek, B. & Achtman, M. (1993).** The 5C protein of *Neisseria meningitidis* is highly immunogenic in humans and induces bactericidal antibodies. *J Infect Dis* **167**, 1065-1073.
215. **Ross, R. F. (2006).** *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia. *Anim Health Res Rev* **7**, 13-29.
216. **Rossi-Campos, A., Anderson, C., Gerlach, G. F., Klashinsky, S., Potter, A. A. & Willson, P. J. (1992).** Immunization of pigs against *Actinobacillus pleuropneumoniae* with two recombinant protein preparations. *Vaccine* **10**, 512-518.
217. **Rubin, L. G., Zwahlen, A. & Moxon, E. R. (1985).** Role of intravascular replication in the pathogenesis of experimental bacteremia due to *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis* **152**, 307-314.
218. **Rudel, T., Boxberger, H. J. & Meyer, T. F. (1995a).** Pilus biogenesis and epithelial cell adherence of *Neisseria gonorrhoeae* pilC double knock-out mutants. *Mol Microbiol* **17**, 1057-1071.
219. **Rudel, T., Facius, D., Barten, R., Scheuerpflug, I., Nonnenmacher, E. & Meyer, T. F. (1995b).** Role of pili and the phase-variable PilC protein in natural competence for transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7986-7990.
220. **Ryan, K. C., G., R., Ahmad, N. W., L., D. & J., P. (2010).** *Sherris Medical Microbiology, Fifth Edition* The McGraw-Hill Companies, Inc. .
221. **Rycroft, A. N. & Cullen, J. M. (1990).** Complement resistance in *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* infection of swine. *Am J Vet Res* **51**, 1449-1453.
222. **Rycroft, A. N., Williams, D., Cullen, J. M. & Macdonald, J. (1991).** The cytotoxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (pleurotoxin) is distinct from the haemolysin and is associated with a 120 kDa polypeptide. *J Gen Microbiol* **137**, 561-568.

223. **Sadilkova, L., Osicka, R., Sulc, M., Linhartova, I., Novak, P. & Sebo, P. (2008).** Single-step affinity purification of recombinant proteins using a self-excising module from *Neisseria meningitidis* FrpC. *Protein Sci* **17**, 1834-1843.
224. **Sakiyama, T., Ueno, H., Homma, H., Numata, O. & Kuwabara, T. (2006).** Purification and characterization of a hemolysin-like protein, Sll1951, a nontoxic member of the RTX protein family from the *Cyanobacterium Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* **188**, 3535-3542.
225. **Sarkari, J., Pandit, N., Moxon, E. R. & Achtman, M. (1994).** Variable expression of the Opc outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by size variation of a promoter containing poly-cytidine. *Mol Microbiol* **13**, 207-217.
226. **Sauer, F. G., Mulvey, M. A., Schilling, J. D., Martinez, J. J. & Hultgren, S. J. (2000).** Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **3**, 65-72.
227. **Saurin, W., Hofnung, M. & Dassa, E. (1999).** Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol* **48**, 22-41.
228. **Scarselli, M., Serruto, D., Montanari, P., Capecchi, B., Adu-Bobie, J., Veggi, D., Rappuoli, R., Pizza, M. & Arico, B. (2006).** *Neisseria meningitidis* NhhA is a multifunctional trimeric autotransporter adhesin. *Mol Microbiol* **61**, 631-644.
229. **Schaller, A., Kuhn, R., Kuhnert, P., Nicolet, J., Anderson, T. J., MacInnes, J. I., Segers, R. P. & Frey, J. (1999).** Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* **145** (Pt 8), 2105-2116.
230. **Schryvers, A. B. & Morris, L. J. (1988).** Identification and characterization of the transferrin receptor from *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **2**, 281-288.
231. **Schryvers, A. B. & Stojiljkovic, I. (1999).** Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* **32**, 1117-1123.
232. **Sebunya, T. N. & Saunders, J. R. (1983).** *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine: a review. *J Am Vet Med Assoc* **182**, 1331-1337.
233. **Seiler, A., Reinhardt, R., Sarkari, J., Caugant, D. A. & Achtman, M. (1996).** Allelic polymorphism and site-specific recombination in the *opc* locus of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **19**, 841-856.
234. **Serebrin, S., Rosendal, S., Valdivieso-Garcia, A. & Little, P. B. (1991).** Endothelial cytotoxicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Res Vet Sci* **50**, 18-22.
235. **Shao, M., Wang, Y., Wang, C., Guo, Y., Peng, Y., Liu, J., Li, G., Liu, H. & Liu, S. (2010).** Evaluation of multicomponent recombinant vaccines against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mice. *Acta Vet Scand* **52**, 52.
236. **Shewen, P. E. & Wilkie, B. N. (1982).** Cytotoxin of *Pasteurella haemolytica* acting on bovine leukocytes. *Infect Immun* **35**, 91-94.

237. **Shope, R. E. (1964a).** The Epidemiology of the Origin and Perpetuation of a New Disease. *Perspect Biol Med* **7**, 263-278.
238. **Shope, R. E., White, D. C. & Leidy, G. (1964b).** Porcine Contagious Pleuropneumonia. Ii. Studies of the Pathogenicity of the Etiological Agent, *Hemophilus Pleuropneumoniae*. *J Exp Med* **119**, 369-375.
239. **Shuker, S. B., Mariani, V. L., Herger, B. E. & Dennison, K. J. (2003).** Understanding HTLV-I protease. *Chem Biol* **10**, 373-380.
240. **Siddaramappa, S., Challacombe, J. F., Petersen, J. M., Pillai, S., Hogg, G. & Kuske, C. R. (2011).** Common ancestry and novel genetic traits of *Francisella novicida*-like isolates from North America and Australia as revealed by comparative genomic analyses. *Appl Environ Microbiol* **77**, 5110-5122.
241. **Sidibe, M., Messier, S., Lariviere, S., Gottschalk, M. & Mittal, K. R. (1993).** Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the porcine upper respiratory tract as a complement to serological tests. *Can J Vet Res* **57**, 204-208.
242. **Simonson, C., Brener, D. & DeVoe, I. W. (1982).** Expression of a high-affinity mechanism for acquisition of transferrin iron by *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **36**, 107-113.
243. **Simpson, A. J., Reinach, F. C., Arruda, P. & other authors (2000).** The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. *Nature* **406**, 151-159.
244. **Simpson, D. L., Berthold, P. & Taichman, N. S. (1988).** Killing of human myelomonocytic leukemia and lymphocytic cell lines by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect Immun* **56**, 1162-1166.
245. **Skerker, J. M. & Berg, H. C. (2001).** Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6901-6904.
246. **Stanley, P., Koronakis, V. & Hughes, C. (1998).** Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 309-333.
247. **Stanley, P. L., Diaz, P., Bailey, M. J., Gygi, D., Juarez, A. & Hughes, C. (1993).** Loss of activity in the secreted form of *Escherichia coli* haemolysin caused by an *rfaP* lesion in core lipopolysaccharide assembly. *Mol Microbiol* **10**, 781-787.
248. **Stephens, D. S. & McGee, Z. A. (1981).** Attachment of *Neisseria meningitidis* to human mucosal surfaces: influence of pili and type of receptor cell. *J Infect Dis* **143**, 525-532.
249. **Stephens, D. S. & Farley, M. M. (1991).** Pathogenic events during infection of the human nasopharynx with *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*. *Rev Infect Dis* **13**, 22-33.

250. **Stephens, D. S. (2009).** Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* **27 Suppl 2**, B71-77.
251. **Stevens, P. & van Elsas, J. D. (2010).** Genetic and phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 strains obtained from Dutch waterways. *Antonie Van Leeuwenhoek* **97**, 171-188.
252. **Stevenson, A., Macdonald, J. & Roberts, M. (2003).** Cloning and characterisation of type 4 fimbrial genes from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* **92**, 121-134.
253. **Stewart, D. J. & Elleman, T. C. (1987).** A *Bacteroides nodosus* pili vaccine produced by recombinant DNA for the prevention and treatment of foot-rot in sheep. *Aust Vet J* **64**, 79-81.
254. **Stone, B. J. & Abu Kwaik, Y. (1998).** Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect Immun* **66**, 1768-1775.
255. **Strathdee, C. A. & Lo, R. Y. (1989).** Regulation of expression of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin determinant. *J Bacteriol* **171**, 5955-5962.
256. **Strom, M. S. & Lory, S. (1993).** Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annu Rev Microbiol* **47**, 565-596.
257. **Sun, Y., Clinkenbeard, K. D., Cudd, L. A., Clarke, C. R. & Clinkenbeard, P. A. (1999).** Correlation of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin binding with susceptibility to intoxication of lymphoid cells from various species. *Infect Immun* **67**, 6264-6269.
258. **Suttorp, N., Floer, B., Schnittler, H., Seeger, W. & Bhakdi, S. (1990).** Effects of *Escherichia coli* hemolysin on endothelial cell function. *Infect Immun* **58**, 3796-3801.
259. **Swanson, J. (1978).** Studies on gonococcus infection. XIV. Cell wall protein differences among color/opacity colony variants of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* **21**, 292-302.
260. **Szabo, G., Gray, M. C. & Hewlett, E. L. (1994).** Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* produces ion conductance across artificial lipid bilayers in a calcium- and polarity-dependent manner. *J Biol Chem* **269**, 22496-22499.
261. **Taichman, N. S., Shenker, B. J., Tsai, C. C., Glickman, L. T., Baehni, P. C., Stevens, R. & Hammond, B. F. (1984).** Cytopathic effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* on monkey blood leukocytes. *J Periodontal Res* **19**, 133-145.
262. **Taichman, N. S., Simpson, D. L., Sakurada, S., Cranfield, M., DiRienzo, J. & Slots, J. (1987).** Comparative studies on the biology of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin in primates. *Oral Microbiol Immunol* **2**, 97-104.
263. **Taichman, N. S., Iwase, M., Korchak, H., Berthold, P. & Lally, E. T. (1991).** Membranolytic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *J Periodontal Res* **26**, 258-260.

264. **Taylor, D. J. B. E. S., S. D’Allaire, W. L. Mengeling, and D. J. Taylor (1999).** *Diseases of swine*. Oxford, United Kingdom: Blackwell Science.
265. **Tettelin, H., Saunders, N. J., Heidelberg, J. & other authors (2000).** Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science* **287**, 1809-1815.
266. **Theunissen, S., De Smet, L., Dansercoer, A., Motte, B., Coenye, T., Van Beeumen, J. J., Devreese, B., Savvides, S. N. & Vergauwen, B. (2010).** The 285 kDa Bap/RTX hybrid cell surface protein (SO4317) of *Shewanella oneidensis* MR-1 is a key mediator of biofilm formation. *Res Microbiol* **161**, 144-152.
267. **Thomas, C. E. & Sparling, P. F. (1994).** Identification and cloning of a fur homologue from *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **11**, 725-737.
268. **Thompson, S. A. & Sparling, P. F. (1993a).** The RTX cytotoxin-related FrpA protein of *Neisseria meningitidis* is secreted extracellularly by meningococci and by HlyBD+ *Escherichia coli*. *Infect Immun* **61**, 2906-2911.
269. **Thompson, S. A., Wang, L. L. & Sparling, P. F. (1993b).** Cloning and nucleotide sequence of frpC, a second gene from *Neisseria meningitidis* encoding a protein similar to RTX cytotoxins. *Mol Microbiol* **9**, 85-96.
270. **Thompson, S. A., Wang, L. L., West, A. & Sparling, P. F. (1993c).** *Neisseria meningitidis* produces iron-regulated proteins related to the RTX family of exoproteins. *J Bacteriol* **175**, 811-818.
271. **Thumbikat, P., Briggs, R. E., Kannan, M. S. & Maheswaran, S. K. (2003).** Biological effects of two genetically defined leukotoxin mutants of *Mannheimia haemolytica*. *Microb Pathog* **34**, 217-226.
272. **Umelo-Njaka, E., Bingle, W. H., Borchani, F., Le, K. D., Awram, P., Blake, T., Nomellini, J. F. & Smit, J. (2002).** *Caulobacter crescentus* synthesizes an S-layer-editing metalloprotease possessing a domain sharing sequence similarity with its paracrystalline S-layer protein. *J Bacteriol* **184**, 2709-2718.
273. **Unkmeir, A., Kammerer, U., Stade, A., Hubner, C., Haller, S., Kolb-Maurer, A., Frosch, M. & Dietrich, G. (2002a).** Lipooligosaccharide and polysaccharide capsule: virulence factors of *Neisseria meningitidis* that determine meningococcal interaction with human dendritic cells. *Infect Immun* **70**, 2454-2462.
274. **Unkmeir, A., Latsch, K., Dietrich, G., Wintermeyer, E., Schinke, B., Schwender, S., Kim, K. S., Eigenthaler, M. & Frosch, M. (2002b).** Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. *Mol Microbiol* **46**, 933-946.
275. **Utrera, V. & Pijoan, C. (1991).** Fimbriae in *A. pleuropneumoniae* strains isolated from pig respiratory tracts. *Vet Rec* **128**, 357-358.

276. **Van de Beek, D., Weisfelt, M., Hoogman, M., de Gans, J. & Schmand, B. (2006).** Neuropsychological sequelae of bacterial meningitis: the influence of alcoholism and adjunctive dexamethasone therapy. *Brain* **129**, E46; author reply E47.
277. **Van den Bosch, H. & Frey, J. (2003).** Interference of outer membrane protein PalA with protective immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in vaccinated pigs. *Vaccine* **21**, 3601-3607.
278. **Van Deuren, M., Brandtzaeg, P. & van der Meer, J. W. (2000).** Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev* **13**, 144-166, table of contents.
279. **Van Overbeke, I., Chiers, K., Ducatelle, R. & Haesebrouck, F. (2001).** Effect of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with a vaccine containing Apx toxins and transferrin-binding proteins. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **48**, 15-20.
280. **Van Overbeke, I., Chiers, K., Charlier, G., Vandenberghe, I., Van Beeumen, J., Ducatelle, R. & Haesebrouck, F. (2002).** Characterization of the *in vitro* adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine alveolar epithelial cells. *Vet Microbiol* **88**, 59-74.
281. **Vik, A., Aas, F. E., Anonsen, J. H., Bilsborough, S., Schneider, A., Egge-Jacobsen, W. & Koomey, M. (2009).** Broad spectrum O-linked protein glycosylation in the human pathogen *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 4447-4452.
282. **Virji, M., Kayhty, H., Ferguson, D. J., Alexandrescu, C., Heckels, J. E. & Moxon, E. R. (1991).** The role of pili in the interactions of pathogenic *Neisseria* with cultured human endothelial cells. *Mol Microbiol* **5**, 1831-1841.
283. **Virji, M., Alexandrescu, C., Ferguson, D. J., Saunders, J. R. & Moxon, E. R. (1992).** Variations in the expression of pili: the effect on adherence of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells. *Mol Microbiol* **6**, 1271-1279.
284. **Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D. J., Achtman, M. & Moxon, E. R. (1993).** Meningococcal Opa and Opc proteins: their role in colonization and invasion of human epithelial and endothelial cells. *Mol Microbiol* **10**, 499-510.
285. **Virji, M., Makepeace, K. & Moxon, E. R. (1994).** Distinct mechanisms of interactions of Opc-expressing meningococci at apical and basolateral surfaces of human endothelial cells; the role of integrins in apical interactions. *Mol Microbiol* **14**, 173-184.
286. **Virji, M., Makepeace, K., Peak, I., Payne, G., Saunders, J. R., Ferguson, D. J. & Moxon, E. R. (1995).** Functional implications of the expression of PilC proteins in meningococci. *Mol Microbiol* **16**, 1087-1097.
287. **Vojtova-Vodolanova, J., Basler, M., Osicka, R., Knapp, O., Maier, E., Cerny, J., Benada, O., Benz, R. & Sebo, P. (2009).** Oligomerization is involved in pore formation by *Bordetella* adenylate cyclase toxin. *FASEB J* **23**, 2831-2843.

288. Wang, C., Wang, Y., Shao, M., Si, W., Liu, H., Chang, Y., Peng, W., Kong, X. & Liu, S. (2009). Positive role for rAp_{IVN} in the immune protection of pigs against infection by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vaccine* **27**, 5816-5821.
289. Wang, R. C., Seror, S. J., Blight, M., Pratt, J. M., Broome-Smith, J. K. & Holland, I. B. (1991). Analysis of the membrane organization of an *Escherichia coli* protein translocator, HlyB, a member of a large family of prokaryote and eukaryote surface transport proteins. *J Mol Biol* **217**, 441-454.
290. Ward, C. K. & Inzana, T. J. (1994). Resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to bactericidal antibody and complement is mediated by capsular polysaccharide and blocking antibody specific for lipopolysaccharide. *J Immunol* **153**, 2110-2121.
291. Weber, M. V., Claus, H., Maiden, M. C., Frosch, M. & Vogel, U. (2006). Genetic mechanisms for loss of encapsulation in polysialyltransferase-gene-positive meningococci isolated from healthy carriers. *Int J Med Microbiol* **296**, 475-484.
292. Weinberg, E. D. (1978). Iron and infection. *Microbiol Rev* **42**, 45-66.
293. Welch, R. A. (1991). Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **5**, 521-528.
294. Welch, R. A., Forestier, C., Lobo, A., Pellett, S., Thomas, W., Jr. & Rowe, G. (1992). The synthesis and function of the *Escherichia coli* hemolysin and related RTX exotoxins. *FEMS Microbiol Immunol* **5**, 29-36.
295. Wetzler, L. M. (2010). Innate immune function of the neisserial porins and the relationship to vaccine adjuvant activity. *Future Microbiol* **5**, 749-758.
296. Weyand, N. J., Calton, C. M., Higashi, D. L., Kanack, K. J. & So, M. (2010). Presenilin/gamma-secretase cleaves CD46 in response to *Neisseria* infection. *J Immunol* **184**, 694-701.
297. Whalen, C. M., Hockin, J. C., Ryan, A. & Ashton, F. (1995). The changing epidemiology of invasive meningococcal disease in Canada, 1985 through 1992. Emergence of a virulent clone of *Neisseria meningitidis*. *JAMA* **273**, 390-394.
298. Whitby, P. W., VanWagoner, T. M., Taylor, A. A., Seale, T. W., Morton, D. J., LiPuma, J. J. & Stull, T. L. (2006). Identification of an RTX determinant of *Burkholderia cenocepacia* J2315 by subtractive hybridization. *J Med Microbiol* **55**, 11-21.
299. Wolfgang, M., van Putten, J. P., Hayes, S. F., Dorward, D. & Koomey, M. (2000). Components and dynamics of fiber formation define a ubiquitous biogenesis pathway for bacterial pili. *EMBO J* **19**, 6408-6418.
300. Wooldridge, K. G., Kizil, M., Wells, D. B. & Ala'aldien, D. A. (2005). Unusual genetic organization of a functional type I protein secretion system in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **73**, 5554-5567.

301. **Xu, F., Chen, X., Shi, A., Yang, B., Wang, J., Li, Y., Guo, X., Blackall, P. J. & Yang, H. (2006).** Characterization and immunogenicity of an apxIA mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* **118**, 230-239.
302. **Zhang, Y., Tennent, J. M., Ingham, A., Beddome, G., Prideaux, C. & Michalski, W. P. (2000).** Identification of type 4 fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **189**, 15-18.
303. **Zhu, P., Morelli, G. & Achtman, M. (1999).** The *opcA* and (psi)*opcB* regions in *Neisseria*: genes, pseudogenes, deletions, insertion elements and DNA islands. *Mol Microbiol* **33**, 635-650.
304. **Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W. & Romling, U. (2001).** The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* **39**, 1452-1463.

10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ABC	membránový transportér (z angl. A TP B inding C assette)
AC	adenylát cyklasa, adenylát cyklasový, -á, -é
ACP	acyl přenášející protein (z angl. A cy- C arrier P rotein)
ADP	adenosindifosfát
Amp	ampicilin
APC	antigen prezentující buňka (z angl. antigen-presentig cell)
<i>apfA-D</i>	geny kódující fimbrie u <i>A. pleuropneumoniae</i>
ApfA	fimbriální protein <i>A. pleuropneumoniae</i>
APS	persulfát amonný
ATP	adenosintrifosfát
BCG	bacillus Calmette-Guérin
β-NAD	β-nikotinamid adenin dinukleotid (z angl. N icotinamide A denine D inucleotide)
bp	páry basí (z angl. base pairs)
BSA	hovězí sérový albumin
cAMP	adenosin-3',5'-(cyklický) monofosfát
Cat	chloramfenikol acetyltransferasa
CAECAM	molekula buněčné adheze (z angl. C arcino E mbryonic A ntigen-related C ell A dhesion M olecule)
CBD	chitin-vázající doména (z angl. C hitin- B inding D omain)
CD	klastr difference
CNS	centrální nervová soustava
CSF	mozkomíšni mok (z angl. C erebro- S pinal F luid)
CyaA	adenylát cyklasový toxin (= ACT)
<i>cyaA</i>	gen kódující adenylát cyklasový toxin
<i>cyaB</i>	gen kódující jeden z proteinů zajišťujících sekreci adenylát cyklasového toxinu
<i>cyaC</i>	gen kódující acyltransferasu umožňující posttranslační modifikaci adenylát cyklasového toxinu mastnou kyselinou
CyaC	acyltransferasa zjišťující posttranslační modifikaci ACT
<i>cyaD</i>	gen kódující jeden z proteinů zajišťujících sekreci adenylát cyklasového toxinu
<i>cyaE</i>	gen kódující jeden z proteinů zajišťujících sekreci adenylát cyklasového toxinu
λ-DNA	DNA bakteriofága lambda
DEAE	diethylaminoethyl
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	kyselina deoxyribonukleová
dNTP	deoxyribonuklesidtrifosfát
dsDNA	dvouvláknová forma DNA
DTT	dithiothreitol
ECM	mimobuněčná hmota (z angl. E xtra C ellular M atrix)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	jedna z nejpoužívanějších imunologických metod sloužících k detekci protilátek, příp. antigenů (z angl. E ntzyme- L inked I mmuno S orbent A ssay)
FLAG	epitop kódovaný sekvencí MDYKAFDNL
<i>frpA,C</i>	geny kódující železem-regulovaný protein A, C z <i>N. meningitidis</i>
FrpA,C	železem-regulovaný protein A, C z <i>N. meningitidis</i> (z angl. F errum- R egulated P rotein A, C)
Fur	bakteriální protein regulující příjem železa (z angl. F erric U ptake R egulator)
G.C. agar	selektivní půda pro kultivaci <i>Neisseria</i> spp., <i>Gonococci</i> spp. a <i>Haemophilus</i> spp. (z angl. G onococci)
GST	glutathion S-transferasa
HAP	<i>Haemophilus-Actinobacillus-Pasteurella</i>
HlyA	α-hemolysin bakterie <i>E. coli</i>
IPTG	isopropyl β-D-thiogalaktopyranosid
kDa	kiloDalton
LacZ	β-galaktosidasa
LB	Luria-Bertani
LktA	leukotoxin bakterie <i>P. haemolytica</i>
LPS	lipopolysacharid

LOS	lipooligosacharid
LtxA	leukotoxin bakterie <i>A. actinomycetemcomitans</i>
M ⁺⁺	malé bivalentní kationty
MalE	maltosu-vázající protein E
MARTX	M ultiple A ctivity RTX Protein
MFP	M embrane F usion P rotein
MHC	hlavní histokompatibilitní komplex (z angl. M ajor H istocompatibility C omplex)
NEB	New England BioLabs
NMR	nukleární magnetická resonance (z angl. N uclear M agnetic R esonance)
OD	optická densita
PBS	pufrační roztok s obsahem fosforečnanů (z angl. P hosphate- B uffered S aline)
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. P olymerase- C hain R eaction)
r	rekombinantní
RT	pokojová teplota
RTX	označení skupiny toxinů (z angl. R epeats in T o X in)
RtxB	ATP-vázající protein vnitřní membrány, součást sekrečního systému typu I
<i>rtxB</i>	gen kódující ATP-vázající protein vnitřní membrány
RtxD	membránový periplasmatický protein, součást sekrečního systému typu I
<i>rtxC</i>	gen kódující membránový periplasmatický protein
RtxE	kanálový protein vnější membrány, součást sekrečního systému typu I
<i>rtxE</i>	gen kódující kanálový protein vnější membrány
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforesa v SDS-polyakrylamidovém gelu
SPM	samoštěpící modul – část sekvence proteinu FrpC (z angl. S elf- P rocessing M odule)
ssDNA	jednovláknová forma DNA
t	reakční čas [min]
T7/IMPACT	systém umožňující afinitní purifikaci proteinů (z angl. I ntein M ediated P urification with an A ffinity C hitin-binding T ag)
<i>tbpA,B</i>	geny kódující bakteriální proteiny vázající transferin (z angl. T ransferrin- B inding P rotein)
TbpA,B	bakteriální proteiny umožňující vazbu transferinu
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
U	jednotka (z angl. unit)
UV záření	ultrafialové záření
w.t.	označení pro původní protein (z angl. W ild T ype)
X	libovolná aminokyselina